

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. NICOLAS MATER

le vendredi 20 juin 2014

Titre :

EVALUATION DE L'IMPACT (ECO)TOXICOLOGIQUE DE RESIDUS MEDICAMENTEUX PRESENTS DANS LES EFFLUENTS HOSPITALIERS, URBAINS ET DANS L'ENVIRONNEMENT A L'AIDE D'UNE BATTERIE DE BIOESSAIS ET DE BIOMARQUEURS

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

Directeur(s) de Thèse :

MME ANNIE LESZKOWICZ

Rapporteurs :

M. BENOIT ROIG, UNIVERSITE DE NIMES
Mme JEANNE GARRIC, IRSTEA

Membre(s) du jury :

M. MICHEL DE MEO, UNIVERSITE AIX-MARSEILLE 2, Président
Mme ANNIE LESZKOWICZ, INP TOULOUSE, Membre
Mme FLORENCE GERET, UNIVERSITE TOULOUSE 2, Membre
Mme VIRGINIE FAUCET MARQUIS, INP TOULOUSE, Membre

« Va donc savoir quand tu sais pas… »

Coluche.

Bien que le travail de thèse représente, certes, dans la vie de chaque aspirant docteur, une étape longue et fastidieuse souvent parsemée de doutes, cela reste et restera pour moi un enrichissement personnel et professionnel exceptionnel. Ces trois années (et demie) de recherches, où j'ai eu la chance de rencontrer et de travailler avec des personnes exceptionnelles, s'achèvent ici avec l'écriture de mes remerciements…

Je tiens à remercier tout d'abord ma directrice de thèse, le Pr. **Annie Leszkowicz,** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son aide, sa disponibilité et ses conseils, ont été d'une grande importance dans la réalisation de mon travail de doctorat, tout en me laissant une grande autonomie. Je ne la remercierai jamais assez pour la confiance qu'elle a su m'accorder à chaque instant, ainsi que pour m'avoir donné à plusieurs reprises la chance de présenter mes travaux lors de congrès scientifiques internationaux. Bien que cela permette à tout à chacun de se grandir intellectuellement, ce privilège n'est pas toujours laissé aux doctorants et je sais combien je lui suis redevable.

Je tiens ensuite à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'y participer. Je remercie notamment le Dr. **Jeanne Garric** et le Pr. **Benoit Roig** d'avoir accepté de porter un intérêt à ce travail et d'en être les rapporteurs malgré leurs emplois du temps bien remplis. Je remercie le Dr. **Michel Pierre De Meo** de présider le jury lors de ma soutenance de thèse. Je remercie le Dr. **Florence Geret** pour être présente dans ce jury de thèse, pour sa collaboration dans l'utilisation des bioessais, son aide et sa gentillesse. Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. **Virginie Faucet-Marquis** pour sa présence, mais surtout pour son aide et ses conseils judicieux tout au long de ma thèse. Elle a été pour moi d'un soutien indéfectible qui m'a initié à beaucoup de techniques, et m'a accompagné en toute simplicité dans de nombreux moments, tant sur le plan travail qu'au niveau des pauses gâteaux matinales.

Je remercie le Dr. **Claire Albasi**, ainsi que toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au sein des divers projets : **Jordan**, **Isariebel**, **Sylvie**, **Clémence**, **Sara**, **Laura**, etc.

Je remercie les Dr. **Sélim Ait-Aïssa** et **Luis Castillo** de m'avoir accompagné au travers de mes comités de thèse. Leurs conseils sur le déroulement de mes travaux m'ont été d'une grande aide.

Je remercie les organismes qui m'ont financée : l'**Agence Nationale de la Recherche** à travers le projet **PANACEE**, ainsi que **VEOLIA Eau Recherches et Innovation**. Je remercie également l'équipe de l'**ICRA** et le projet trans Pyrénéen **MbrMed**.

Un grand merci au Dr. **Marie Carmen Monje**, pour sa gentillesse, son écoute et son soutien aux moments de mes premiers pas dans le monde tumultueux de la recherche. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir apporté cette gaité qui a pu faire défaut à certains moments au laboratoire. Merci aussi d'avoir pris des nouvelles si souvent. Je remercie **Marion** ainsi que mon « petit » **Jean-Yves** pour toute leur aide, leur bonne humeur, et pour tous ces moments passés à rire ensemble autour de ces nombreuses pauses cafés.

Je remercie également tous les membres du laboratoire que j'ai pu rencontrer ou côtoyer, pour leur sympathie, leurs pâtisseries, leur humour, et leur aide scientifique ou non : **Kheira, Patricia, Marianna, Safwan, Rayenne, Philippe, Nathalie, Sylvain, Estelle, …**

Bien évidemment, un grand merci à tous les **amis** qui m'ont apporté de près ou de loin leur soutien et leur aide au cours de ma thèse et lors de la rédaction.

Je pense notamment à toi **Grigou**, alias « Magret 09 », mon coloc' et partenaire de thèse. Je te remercie pour ton soutien, ton humour immuable et pour m'avoir supporté significativement (p<0,01) au travers de tout ce qu'on a vécu ensemble ces quatre dernières années (et il y en a eu hein!).
Evidemment, que serait ces remerciements sans citer le troisième trouble-fête, l'homme incontournable de la triade… A toi **Mickey**, dit la « moulinette de Bessège», merci d'avoir su être présent malgré ton travail harassant (je plaisante évidemment !), de nous avoir motivé, de nous avoir trainé si souvent jusqu'à flunch, et de nous avoir vendu du rêve pour nous faire oublier la thèse ! Merci les saucisses, vous avez été au top !

Je remercie également mes deux américaines préférées **Cece** et **Cristella**, deux amies chère à mes yeux. Votre rencontre et tous ces moments partagés ont créé l'atmosphère propice au démarrage decette thèse sur les chapeaux de roue**.** Merci également à vous **Mimine, Poussin et Jbou** d'avoir participé à bon nombre de ces souvenirs.

Je n'oublie pas non plus mes acolytes de très longue date, avec qui j'ai vécu mes premières heures de science sur les bancs de la fac, et à qui j'ai souvent pensé. Malgré la distance, ils ont su m'apporter à leur manière leur soutien… Merci à vous **Yasminette & Valochon, Juls, Tafou & Laura,** et **Nono** l'exploratrice !

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement mon amoureuse, **Gaëlle.** A toi mon soutien « number one », merci pour ton écoute, ta patience, et surtout pour l'équilibre que tu m'apportes tous les jours. Tu as su me faire relativiser dans les moments de doute, et c'est pour cela que tu es la meilleure. Of course, merci aussi pour ton aide en anglais et pour tes muffins au chocolat si bons pour le moral.

Mes derniers remerciements vont à mes **parents**, à qui je dois tout (ou presque) ces dix dernières années (déjà ?). Que serais-je devenu sans votre soutien et votre attention irréprochable à mon égard. Votre humanisme et votre philosophie de la vie ont été pour moi d'une grande inspiration, et m'ont aidé à en arriver là aujourd'hui.… Merci.

Je terminerai ces remerciements avec une pensée toute particulière pour ces bactéries, ces algues, ces plantes et ces cellules qui ont donné leurs « corps » à ma science. Bien que vous ne soyez plus là, je vous remercie pour tout et ne vous oublierai pas…*R.I.P*.

Table des matières

Partie 2: Application de la batterie de tests d'écotoxicité pour la caractérisation et le suivi d'effluents hospitaliers et urbains.

Nomenclatures

^{32}P	Phosphore 32
AC-MS	Spectrométrie de masse à accélérateur de particules
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFNOR	Agence Française de Normalisation
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AOX	Composés organohalogénés absorbables sur charbon actif
APA	Acide peracétique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine tri phosphate
B[a]P	Benzo[a]pyrène
BET	Bromure d'ethidium
Bq	Becquerel
CA	Concentration d'addition
CE_{50}	Concentration efficace 50 %
CIRC	Centre international de recherche contre le cancer (= IARC)
CL_{50}	Concentration létale 50
CMC	Concentration micellaire critique.
COX	Cyclooxygénase
CPM	Coups par minute
CSE	Concentration sans effet
CYP	Cytochrome P450
DBO	Demande biologique en oxygène
DCE	Directive cadre européenne sur l'eau
DCO	Demande chimique en oxygène
DL50	Dose léthale 50
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthyl sulfoxide
D.O	Densité optique
DPM	Désintégrations par minute
DRASS	Direction régionale des affaires aanitaires et aociales
DTT	DL-Dithiolhréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EPA	*Environmental Protection Agency*
GST	Glutathion-S-transférase
HAP	Hydrocarbures polycycliques aromatiques
HPLC	Chromatographie liquide de haute performance
IA	Action Indépendante
IARC	*International Agency for Research on Cancer* (= CIRC)
IC95	Intervalle de Confiance à 95%
IRSN	**I**nstitut de **R**adioprotection et de **S**ûreté **N**ucléaire

ISO	Organisation internationale de normalisation
LIPOX	Lipoxygénase
LOD	Limite de détection
LOEC	*Lowest Observed Concentration Effect* (plus petite concentration effective)
LOQ	Limite de quantification
MES	Matière en suspension
MN	Nucléase de staphylocoque
MS	Spectrométrie de masse
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite
NER	Réparation par excision de nucléotides
NOEC	*Non Observed Concentration Effect* (concentration sans effet observé).
NP1	Nucléase P1
NQE	Normes de Qualité Environnementale
OCDE	Organisation du commerce et du développement economique
OMS	Organisation mondiale de la santé
OTM	Olive Tail Moment
PBS :	Phosphate Buffer Saline ou Tampon phosphate salin
PCB	PolyChloroBiphényle
PEC	*Predictive Environmental Concentration* (concentration environnementale prévisible)
PEI	Polyéthylène imine
PGHS	Prostaglandine H synthétase
PL	Peroxydation lipidique
PM	Poids moléculaire
PNEC	*Predictive No Effect Concentration* (concentration sans effet prévisible sur l'environnement)
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SET :	Mélange de NaCl, de TRIS et d'EDTA
SPD	Phosphodiestérase de rate
STEP	Station d'épuration
SVF	Sérum de veaux fœtal contenant des anticorps antitrypsine
TRIS	Tampon de trishydroxyméthylaminométhane
US EPA	*United States Environmental Protection Agency*
UV	Ultra violet
YES	*Yeast Estrogen Screen* (levure exprimant le récepteur aux œstrogènes hERα)
YAS	*Yeast Androgen Screen* (levure exprimant le récepteur aux androgènes hAR)

Liste des figures

Liste des tableaux

Communications

Publications Nicolas Mater

1. Mater N, Géret F, Castillo L, Marquis-Faucet V, Albasi C, Pfohl-Leszkowiz A**,** (2014). In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water. Environment International 63, 191-200.
2. Mater N, Faucet-Marquis F, Rodriguez-Mozaz S, Albasi C, Pfohl-Leszkowicz A, (2014). Genotoxicity assessment in human cell lines exposed tociprofloxacin, tamoxifene or cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital waste water and surface water. (soumis).
3. Mater N, Rodriguez-Mozaz S, Géret F, Ferrando-Climent L, Barceló D, Albasi C, Pfohl-Leszkowicz A, (2014). Ecotoxic and genotoxic risk assessment of Gerone hospital waste water, inflow and outflow of the municipal WWTP. (en préparation).
4. Mater N, Rodriguez-Mozaz S, Ferrando-Climent L, Barceló D, Geret F, Faucet-Marquis V, Pfohl-Leszkowicz A, (2012). Optimisation de bioessais *in vitro* pour l'évaluation de la toxicité induite par des mélanges de médicaments rejetés dans les effluents hospitaliers – application aux effluents d'un hôpital. Abstract étendu, Colloque Gruttee.

Communication orale

1. Mater N, Geret F, Rodriguez-Mozaz S, Castillo L, Barceló D, Pfohl-Leszkowicz A, (2013). *In vitro bioassays for risk assessment of oncologic treatments released in hospital waste water and surface water.* ***11th International Conference of Environmental Mutagens – 11th ICEM, Nov 2013, Brazil.***
2. Mater N, Géret F, Rodriguez-Mozaz S, Castillo L, Albasi C, Pfohl-Leszkowicz A, (2013). *Molecular tools for assessing ecological risk of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide released in hospital waste water and surface water.* ***2nd International conference on occupational and environmental toxicology, Sept 2013, Porto, Portugal.***
3. Mater N, Rodriguez-Mozaz S, Géret F, Ferrando-Climent L, Barceló D, Pfohl-Leszkowicz A, (2013). *In vitro bioassays for risk assessment of oncologic treatments released in hospital waste water - Application to hospital effluents.* ***International conference "pharmaceutical products in environment: Is there a problem?", June 2013, Nimes, France.***
4. Mater N, Rodriguez-Mozaz S, Ferrando-Climent L, Barceló D, Geret F, Faucet-Marquis V, Pfohl-Leszkowicz A, (2012). *In vitro bioassays for risk assessment induce by mixtures of anticancer drugs released in hospital waste water - Application to hospital effluents.* ***9ème congrès international Gruttee, Octobre 2012, Montpellier, France***
5. Mater N, Geret F, Faucet-Marquis V, Albasi C, Pfohl-Leszkowicz A, (2012). *Optimization of in vitro bioassays for risk assessment of anticancer drugs mixtures released in hospital waste water.* ***1stcytotreath workshop "the effects of residues of cytostatics and other pharmaceuticals on non-target organisms", Oct 2012 Naples, Italie.***

Poster

1. Mater N, Geret F, Rodriguez-Mozaz S, Castillo L, Barceló D, Pfohl-Leszkowicz A, (2013). In vitro bioassays for risk assessment of oncologic treatments released in hospital wastewaters and surface waters. ***11th International Conference of Environmental Mutagens – 11th ICEM, Nov 2013, Brazil.***
2. Mater N, Faucet-Marquis V, Albasi C, Lenoir S, Castillo L, Pfohl-Leszkowicz A, (2011). Evaluation of toxic effects of anticancer drugs mixture released in hospital waste water, using in vitro bioassays***. International Toxicology of Mixtures Conference. Oct. 2011, USA.***
3. Mater N, Faucet-Marquis V, Albasi C, Castillo L, Pfohl-Leszkowicz A, (2011). Ecotoxicity test to evaluate the toxicity of some anticancer drugs released in hospital waste water. ***SETAC Europe 21st Annual Meeting, Ecosystem Protection in a Sustainable World: a Challenge for Science and Regulation. May 2011, Milan, Italy.***

Introduction Générale

Depuis la fin du XXe siècle se pose au niveau mondial le problème de la rareté de l'eau douce. En plus de ce constat, la communauté scientifique s'intéresse depuis de nombreuses années à l'impact des activités anthropiques sur l'état de santé de notre environnement. C'est ainsi que dès le début des années 70, en France, le Pr. Truhaut (1975, 1977) soulevait la question d'un risque croissant pour la santé et l'environnement lié au développement de l'industrie chimique et la médecine. Il soulignait déjà les besoins de connaissances et de recherche sur le devenir et les effets des produits chimiques dans l'environnement. Il proposait en même temps une des premières définitions de l'écotoxicologie (sous-discipline de la toxicologie médicale) et reconnaissait le caractère nécessairement multidisciplinaire des approches.

De nos jours des tonnes de substances pharmacologiquement actives sont consommées annuellement en Europe et dans le monde, de par leurs utilisations en médecine pour le diagnostic, le traitement, ou la prévention de maladies, mais également pour des usages vétérinaires comme promoteurs de croissance, pour empêcher les maladies, ou comme parasiticides. La présence de ces composés pharmaceutiques dans les milieux aquatiques peut compromettre la qualité de l'eau, comme l'indique de nombreuses études (Pomati *et al.*, 2006 ; Jonhson *et al.*, 2008 ; Aga *et al.*, 2008 ; Santos *et al*., 2010). Malheureusement, les niveaux de contamination de ces substances pharmaceutiques sont en augmentation du fait du vieillissement des populations, de la densité grandissante des villes (Le Corre *et al.*, 2012), et de la pénurie d'eau liée aux changements climatiques dans certaines zones géographiques du monde (Osorio *et al.*, 2012 ; Petrovic *et al.*, 2012).

A ce constat vient s'ajouter un nombre de cancers dépistés en Europe toujours plus important avec une augmentation des traitements administrés. Les bases de ces traitements, qui sont la chimiothérapie et la radiothérapie seules ou en association, sont effectuées à l'aide de médicaments anticancéreux qui ont des propriétés toxiques pour les cellules. Un grand nombre de ces subtances sont classées par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) selon trois catégories : cancérogène pour l'Homme (classe 1), cancérogène probable (classe 2A), cancérogène possible (classe 2B).

Après administration aux patients, certains de ces médicaments sont excrétés en quantités importantes et rejetés continuellement dans les effluents hospitaliers puis les réseaux d'égouts où ils se concentrent. Bien que ces rejets dépendent de la quantité de médicaments administrée, de l'efficacité d'excrétion du composé parent et des métabolites par les patients, ou encore de la propension du médicament à s'adsorber aux éléments solides, les effluents hospitaliers représentent une des principales sources de rejets médicamenteux dans l'environnement après les rejets domestiques. Cette problématique est d'autant plus préoccupante du fait que ces établissements génèrent des volumes importants d'effluents liquides contenant des substances spécifiques (médicaments, désinfectants, détergents, révélateurs et fixateurs radiographiques, réactifs chimiques, etc.) et qu'ils sont susceptibles de disséminer des germes pathogènes. De plus, ces effluents sont généralement évacués dans les réseauxurbains sans traitement préalable, au même titre que des eaux usées domestiques classiques.

De manière générale en France, la majorité des eaux usées domestiques, hospitalières et industrielles sont collectées puis épurées dans des stations d'épuration (STEP) avant d'être rejetées dans le milieu naturel (rivières, lacs, mers). Les STEP sont conçues pour épurer les eaux usées et limiter ainsi l'apport en excès dematières organiques et de polluants minéraux dans le milieu naturel. Cependant, bien que de nombreux micropolluants soient éliminés par adsorption ou biodégradation dans les STEP, certaines molécules difficilement biodégradables « traversent » les stations d'épuration sans perdre nécessairement leur caractère (géno)toxique et sont directement rejetées dans le milieu naturel. Parmi les principaux contaminants présents dans l'environnement, on distingue notamment les composésorganiques (hydrocarbures, polychlorobiphényles, pesticides) et les métaux.

Depuis peu, laprésence de polluants « émergeants » regroupant les produitspharmaceutiques et les alkylphénols (ex : nonylphénol) a été mise en évidence. Dans un premier temps, les médicaments étaient rarement considérés comme des polluants environnementaux potentiels du fait de leur utilisation bénéfique pour l'homme. Néanmoins, plusieurs études ont montré la présence récurrente de ces substances pharmaceutiques actives dans l'environnement (Halling-Sorensen *et al*., 1998 ; Daughton & Sternes, 1999 ; Leprat, 1999 ; Emmanuel, 2004b ; Hartemann *et al*., 2006 ; Zounkova *et al.*, 2006), où elles constituent un risque toxique pour la flore, la faune et l'Homme *via* l'eau de boisson (résistance croisée aux traitements, allergie, cancer, etc.). Mais ces études portent rarement sur unecaractérisation physico-chimique et écotoxicologique approfondie des effluents, et les problèmes relatifs à la gestion de ces substances à risque font partie des grandes préoccupations actuelles (Vindimian, 2006).

La directive 2000/60/CE du parlement européen et du conseil du 23 Octobre 2000 établit un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. Elle vise entre autre au maintien et à l'amélioration de l'environnement aquatique. Pour ce faire, les Etats membres ont pour objectif de « parvenir au minimum à un bon état écologique des eaux et lorsque ce bon état est déjà assuré, il doit être maintenu ». Aujourd'hui, la protection et la surveillance des milieux s'appuient largement sur les méthodes de l'écotoxicologie et la définition de normes de qualité environnementale(NQE). Ces normes sont à la base de la réglementation des rejets, de l'évaluation de la qualité chimique des milieux et deleur surveillance imposée par la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE). La mise en œuvre de cette DCE met en évidence la nécessité d'une science prédictive de l'impact des substances chimiques qui s'appuie non seulement sur les mécanismes d'action biotique et abiotique des produits chimiques, mais qui s'intéresse également à la diversité biologique et la réalité du fonctionnement des écosystèmes. Ce faisant, la DCE ignore encore toute une catégorie d'outils biologiques comme les biomarqueurs, qui sont des indicateurs précoces et sensibles capables de révéler l'exposition et/ou la dégradation de la santé d'organismes suite à une pollution. Les éléments de la qualité biologiques retenus permettent un constat, conduisant à engager des processus de remédiation coûteux alors qu'on peut attendre des biomarqueurs une fonction de prévention.

Les biomarqueurs sont des changements structuraux ou fonctionnels observables et/ou mesurables à divers niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, comportementale), qui révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une

substance chimique (Lagadic *et al*., 1997). Ce sont des outils mis en œuvre pour établir un diagnostic de risque environnemental. Concernant plus particulièrement les biomarqueurs de génotoxicité, ils permettent l'évaluation de l'impact des contaminants chimiques sur l'intégrité structurelle de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et peuvent servir dans certains cas d'indicateur prédictif d'effets au niveau populationnel.

Depuis la fin des années 90, plusieurs ouvrages ont fait le point sur cette méthodologie, comme « Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement » (Tec & Lavoisier, 1998). Pourtant les biomarqueurs restent encore d'un emploi très marginal dans les programmes de surveillance de l'environnement.

Synthèse bibliographique

I. Présentation du cadre de l'étude

I.1. Usage et consommation des produits pharmaceutiques en Europe

A l'heure actuelle, les pays industrialisés sont les plus gros consommateurs de produits pharmaceutiques, avec l'Europe, l'Amérique du Nord et le Japon qui représentent environ 80 % du marché mondial pour moins de 15 % de la population (Académie Nationale de Pharmacie, 2008).

En 2006, la France était le 4ème consommateur mondial de médicaments (25 630 M $), après les États-Unis (197 802 M $), le Japon (56 675 M $) et l'Allemagne (27 668 M $) (tableau 1). On peut toutefois souligner qu'il est plus facile d'obtenir des données concernant les chiffres d'affaires que des tonnages fabriqués ou utilisés en France. Le prix de vente des médicaments dans l'hexagone étant plus faible que dans d'autres pays, la France devrait se retrouver en réalité beaucoup plus proche du haut du classement. Une comparaison internationale établie en 2004 (Rapport Landrain, 2004) estimait d'ailleurs la position de la France au deuxième rang mondial derrière les Etats-Unis en volume de consommation de médicaments par habitant et par an. Le montant était alors 2 fois plus élevé qu'aux Pays-Bas et deux fois et demi supérieur à celui du Danemark ou de l'Irlande.

Achat de médicament par les pharmacies de détail		
	Année 2005 en million US $	**Année 2006** en million US $
Monde (sélection)	**370 015**	**388 281**
Amérique du Nord	**196 190**	**211 521**
USA	184 196	197 802
Canada	11 994	13719
Europe	**91 587**	**95 535**
Allemagne	25 733	27 668
France	24 520	25 630
Royaume Uni	14 985	15 666
Italie	14 496	14 942
Espagne	10 852	11 629
Japon (hôpital compris)	**60 273**	**56 675**
Amérique Latine	**16 277**	**18 747**
Brésil	6 760	8 366
Méxique	7 481	8 096
Argentine	2 037	2 285
Australie – Nouvelle Zélande	**5 688**	**5 803**

Tableau 1 : Evolution de la répartition des achats de médicaments par les pharmacies dans le monde entre décembre 2005 et 2006 (d'après IMS Health, 2008).

Cependant, ces dernière années ont été marquées par des améliorations notables en France avec un taux d'évolution le plus bas d'Europe sur la période 2000-2011, tandis que les autres pays, eux, augmentaient plus fortement leur consommation. C'est le cas par exemple de l'Allemagne ou l'Italie qui prennent désormais mieux en charge certaines pathologies comme le diabète ou la dépression. Si, en 2000, la France était en tête dans sept des huit classes thérapeutiques principalement utilisées (antibiotiques, anxiolytiques, antidépresseurs, antiulcéreux, hypolipémiants, antihypertenseurs, antidiabétiques et antiasthmatiques), elle a réussi à freiner la tendance grâce à des campagnes de sensibilisation et des déremboursements. Elle reste malgré tout le premier consommateur européen d'antibiotiques et d'anxiolytiques (consommation sept fois plus importante qu'au Royaume-Uni), sans compter les usages vétérinaires très importants en termes d'antibiotiques, d'hormone ou encore d'antiparasitaire.

I.2. Rappel sur les traitements de chimiothérapie

Dans le monde entier, le nombre de cancers dépistés est en constante progression, entrainant une importante augmentation des traitements. Ces traitements sont la chimiothérapie et la radiothérapie qui peuvent être utilisées ou non en combinaison. La chimiothérapie est réalisée à l'aide d'un grand nombre de médicaments anticancéreux ayant des propriétés toxiques pour les cellules. Ces molécules cytostatiques peuvent agir sur l'inhibition de la croissance cellulaire ou directement tuer celles-ci, mais de manière non sélective entre les cellules saines ou tumorales. La plupart des agents antinéoplasiques ont des propriétés cytotoxiques, mutagéniques, carcinogéniques, embryotoxiques et/ou tératogéniques. Durant les traitements de chimiothérapie, ces médicaments sont éliminés *via* les urines et les fèces des patients en grande partie sous leur forme initiale ou métabolisée.

Il existe aujourd'hui plus de 50 médicaments utilisés en routine en chimiothérapie dans les hôpitaux des pays développés, administrés dans 80 % des cas par voie intraveineuse et 20 % par voie orale. Il est toutefois important de souligner que la majoritéde ces médicaments sont administrés dans les services ambulatoires, le reste étant donné aux patients hospitalisés (BMA, 2006).

Par ailleurs, la demande en traitement de chimiothérapie augmente d'environ 10% par an dans les pays industrialisés (DOH, 2004 ; Health Canada, 2004 ; Summerhayes, 2003). L'augmentation de la consommation des médicaments cytotoxiques est due notamment au large éventail de médicaments disponibles et à leur combinaison possible dans les traitements de chimiothérapie (Allwood *et al*., 2002 ; BMA, 2006). En effet, la chimiothérapie combinée, par administration simultanée de plusieurs agents de chimiothérapie, est devenue la norme (Hartmann *et al*., 1999 ; Varadhachary & Hoff, 2005). D'un point de vue médical, ces médicaments doivent exercer leurs effets rapidement puis être éliminés le plus vite possible ; la majorité des médicaments cytostatiques étant très soluble (Pruijn & DeWitte, 2004), leur présence dans l'environnement représente donc un risque.

I.3. Les effluents hospitaliers

Encore trop peu d'études s'intéressent à la caractérisation des effluents hospitaliers qui sont le plus souvent considérés comme similaires aux effluents domestiques. L'agence environnementale Américaine EPA (1989) précise par exemple que les eaux usées provenant des hôpitaux sont essentiellement domestiques et peuvent être caractérisées par la mesure des paramètres globaux dans les limites suivantes : DBO5 (demande biologique en oxygène pendant 5 jours) : 50 à 400 mg/L, DCO (demande chimique en oxygène) : 150 à 800 mg/L, MEST (matières en suspension totales) : 60 à 200 mg/L et COT (carbone organique total) : 50 à 300 mg/L. Étant donné l'utilisation et les rejets de volumes importants d'eau dans les établissements hospitaliers, les polluants identifiés (métaux, radio-isotopes et autres substances chimiques) sont dilués et se retrouvent à des concentrations souvent voisines de celles des effluents domestiques ». Plusieurs études menées ces dernières années ont montré que les effluents hospitaliers présentaient des caractéristiques physico-chimiques globales tout à fait semblables à la moyenne de celles d'eaux résiduaires urbaines (à l'exception des détergents significativement plus concentrés), et que le niveau de pollution pouvait être plus faible que les effluents domestiques mais avec la présence systématique de germes ayant acquis des caractères de résistance aux antibiotiques (Mansotte *et al.*, 2000 ; Leprat *et al.*, 1999). Mais ces résultats sont trompeurs car ils ne tiennent compte en réalité ni du volume rejeté ni de la composante toxique des effluents. Un établissement de 1000 lits polluerait ainsi autant qu'une ville de 10.000 habitants (Hartemann *et al.*, 2006), sans compter l'utilisation quasi industrielle de nombreux produits chimiques. Il convient donc de s'intéresser aux types de molécules éliminées et non pas à des paramètres physico-chimiques globaux.

I.3.1. Caractéristiques

Les effluents hospitaliers sont des effluents très particuliers où l'on retrouve la présence de nombreux produits pharmaceutiques ainsi que des microorganismes le plus souvent pathogènes et beaucoup de produits désinfectants. Bien que l'on analyse le plus souvent les paramètres physico-chimiques pour tenter de les caractériser (DCO, DBO, MES, NTK), le danger résiderait plus dans la présence de certaines bactéries multirésistantes aux antibiotiques (*Proteus vulgaris*, Mycobactéries) et de certaines souches typiquement hospitalières (*Enterobacter sakazakii*) (SFHH, 1993 ; Leprat, 1998 ; Schwartz *et al.*, 2003 ; Emmanuel *et al.*, 2005 ; Hartemann *et al.*, 2006). Les germes témoins représentent assez fidèlement le risque lié à la présence de pathogènes, dont les caractéristiques de résistance restent finalement assez banales dans le contexte hospitalier, si l'on excepte une résistance assez préoccupante aux antibiotiques de synthèse de la famille des quinolones.

On peut noter également la présence d'éléments radioactifs utilisés en médecine à des fins thérapeutiques ou pour établir des diagnostics *in vivo* ou *in vitro* (Fremery & Rigaud, 2001). Certains de ces éléments sont utilisés en sources non-scellées et sont donc susceptibles d'être dispersés, même si l'évacuation de ces effluents est soumise à une réglementation stricte. On peut citer par exemple l'utilisation d'iode131 pour le traitement de l'hyperthyroïdie des cancers thyroïdiens, rejeté en grande quantité dans les urines (Dremont & Hadjali, 1997).

L'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) est d'ailleurs régulièrement amené à intervenir sur des problèmes liés à la présence de radioactivité artificielle d'origine médicale dans les stationsd'épuration (STEP). L'identification et la quantification des radiopharmaceutiques au sein des réseaux d'assainissement et dans les STEP a notamment permis de mettre en évidence la présence d'iode 131 et le technétium 99m, avec des quantités pouvant dépasser 10 Bq/L dans le cas de l'iode 131 et allant jusqu'à 75 Bq/L dans le cas du technétium 99m (Adam *et al.*, 2006).

Le dernier paramètre qui caractérise les effluents hospitaliers concerne bien évidemment les rejets médicamenteux qui font partie des polluants dits « émergeants » (Chapman, 2006). Bien que les données concernant leur présence et leur diversité dans les effluents aient été pendant longtemps dérisoires, de plus en plus d'études s'y consacrent pour palier ce manque. A l'heure actuelle, les antinéoplasiques et les immunomodulateurs représentent les postes de dépense les plus importants de l'hôpital en général (25,7 %), puis viennent ensuite les médicaments du sang et des organes hématopoïétiques qui se situent au deuxième rang devant les anti-infectieux. Concernant les médicaments liés aux cancers et à l'infection par le virus du sida, ils représentent une part de plus en plus importante des achats de médicaments par les hôpitaux (Cavalié *et al.*, 2005). Enfin, on peut noter que les milieux hospitaliers utilisent aussi de manière importante des produits destinés aux personnels, tels que l'antifongique itraconazole, l'antibiotique vancomycine, etc. (Cavalié *et al.*, 2003 ; Besse & Garric, 2007).

I.3.2. Substances susceptibles d'être à l'origine de la toxicité

Du fait de l'utilisation d'un grand nombre de produits par établissements de santé et de la difficulté à suivre leur évolution jusqu'en STEP puis dans l'environnement, aucune étude à ce jour n'a véritablement réussie a démontré l'origine de l'écotoxicité des effluents hospitaliers.

Une étude menée dans les années 90 sur des hôpitaux de la région Rhône-Alpes a malgré tout permis de confirmer la toxicité élevée des effluents hospitaliers et d'émettre des hypothèses quant aux causes possibles (Deloffre-Bonnamour, 1995). L'hypothèse principale porte sur la présence de rejets contenant des produits détergents et des désinfectants qui sont quantitativement majoritaires dans les effluents. Les quantités de lessives sont par exemple estimée à 12 tonnes / 1000 lits /an, ou encore celles du chlore à 800 kg par an pour un établissement (Mansotte *et al.*, 2000). Cependant, des travaux menés par d'autres équipes soulignent que de par leur activité biologique thérapeutique et leur persistance dans l'environnement, c'est la présence de substances pharmaceutiques qui pourraient expliquer l'écotoxicité des effluents hospitaliers (Kümmerer *et al.*, 1997 ; Halling-Sørensen *et al.*, 1998 ; Cleuvers, 2003 ; Ferrari *et al.*, 2003b ; Emmanuel, 2004). Même si les rejets de ces composés pharmaceutiques sont relativement faibles, il s'avère que ces molécules peuvent induire des effets importants sur la faune aquatique (Hartemann *et al.*, 2006).

L'autre hypothèse concerne l'utilisation d'agents de contraste iodés qui sont persistants dans l'environnement et qui participent activement à la formation d'AOX dans les réseaux d'assainissement (Kümmerer *et al.*, 1998 ; Fent *et al.*, 2006 ; Besse & Garric, 2007).

I.3.2.a. Les surfactants

De manière générale, on désigne par détergents les produits susceptibles de permettre un nettoyage quelconque. Un des principes actifs des détergents est le surfactant (ou agent de surface, ou tensioactif), qui constitue l'essentiel de la partie organique des détergents. Les surfactants sont des molécules amphiphiles, constituées d'une tête hydrophile et d'une queue lipophile.

La tête polaire, chargée ou non, apporte la propriété cationique, anionique, amphotère ou non-ionique au surfactant et favorise la dissolution de la molécule dans les solvants (eau, glycérol, hydrazine, etc.). La queue apolaire est quant à elle formée de chaînes ou cycles hydrocarbonés (Bliefert & Perraud, 2001 ; Lavoué *et al*., 2002). Tant que la concentration en tensioactifs est faible, la partie hydrophobe des surfactants a tendance à fuir les solutions aqueuses et forme spontanément un film mono moléculaire à l'interface qui lui procure un espace disponible. Lorsque la surface libre de la solution aqueuse ne se voit plus capable d'accueillir de nouvelles molécules, le film mono moléculaire entre en compétition avec la formation d'agrégats organisés de molécules : les micelles. On parle alors de la CMC ou Concentration Micellaire Critique (LePerchec & Richard, 1994 ; Lin *et al.*, 2004). La structure des surfactants engendrent des propriétés physico-chimiques spécifiques qui constituent le facteur essentiel dans les opérations de nettoyage (Rodier *et al*., 1996).

On distingue plusieurs types de surfactants :

- **Les surfactants anioniques** qui sont généralement très utilisés et d'origine naturelle (savons, sels d'acides gras). Ils possèdent un pouvoir détergent important et sont également utilisés comme agents hydrotropes pour favoriser la solubilisation dans la solution détergente d'agents peu solubles dans l'eau. Les tensioactifs anioniques présentent une faible activité bactériostatique réversible, ils sont sensibles à la dureté de l'eau et certains sont susceptibles de subir une hydrolyse partielle dans la solution nettoyante (Lavoué *et al*., 2002) ;
- **Les surfactants cationiques** (amines oléiques éthoxylées, diamines oléiques éthoxylées, amides oléiques éthoxylées, ammoniums quaternaires oléiques éthoxylés, ammoniums quaternaires oléiques, dérivés oléiques de l'imidazoline) dont les plus courants sont les ammoniums quaternaires (R-NH3 + X-). Ils sont principalement utilisés pour leurs propriétés fongicides et bactéricides que leur confère leur caractère nitré (Cox, 1994). De ce fait, leur utilisation se limite en général au nettoyage acide (Lavoué *et al*., 2002) ;
- **Les surfactants non-ioniques** (alcools alcoylés, alcyls polyglucosides, alcanolamides non sulfatés, acides gras éthoxylés) possèdent une partie hydrophile permettant la formation de liaison hydrogène avec l'eau en milieu neutre ou alcalin. Ces tensioactifs se caractérisent par une faible sensibilité à la dureté de l'eau, au pH, ainsi que de faibles CMC, qui permettent une efficacité satisfaisante à basse température et en milieu neutre ou faiblement alcalin (Lavoué *et al*., 2002) ;
- **Les surfactants amphotères** (alkylbétaïnes, dérivés de l'imidazolinium, …) qui possèdent une partie hydrophile s'ionisant différemment selon le pH du milieu (Thoumelin, 1995). En raison de leur coût élevé, cette classe de surfactant reste marginale mais est parfois utilisée en association à d'autres surfactants pour améliorer leurs performances (Lavoué *et al*., 2002).

I.3.2.b. Les désinfectants

Les désinfectants sont des produits très largement utilisés en tant que tels ou comme composants de produits cosmétiques (mousse à raser par exemple) dans les hôpitaux, l'industrie et les foyers domestiques. Ces composés appartiennent à différentes classes chimiques et possèdent des spectres d'action variés (bactéricides, bactériostatiques, fongicides, etc.) du fait des différentes spécificités des micro-organismes qui leurs permettent de se protéger des conditions extérieures (Besse & Garric, 2007).

L'utilisation des désinfectants en milieu hospitalier est très diversifiée (désinfection des surfaces, de l'instrumentation, de la peau (antiseptiques), des cuisines, etc.), ce qui engendre deux grandes catégories de substances : les désinfectants courants et les désinfectants à utilisation restreinte (Emmanuel, 2004a). Parmi les désinfectants les plus couramment utilisés, on peut citer :

- **Les produits chlorés** (eau de Javel et autres hypochlorites) qui agissent en oxydant les acides aminés aromatiques des protéines et peuvent induire l'inhibition de certaines enzymes et/ou une modification des protéines structurelles (Russell & Hugo, 2004). Ils contribuent également à la formation d'AOX le plus souvent lipophiles, rémanents dans l'environnement et potentiellement toxiques pour les organismes aquatiques (Carey *et al*., 1998) ;
- **Les produits contenant des aldéhydes et dérivés** (formaldéhyde, glutaraldéhyde, etc.) qui peuvent réagir avec les acides nucléiques et les groupements amines des protéines de structure et de fonction, dénaturer les glycoprotéines de surface, inhiber les fonctions enzymatiques et nucléiques des cellules. Les dialdéhydes peuvent également induire la formation deponts entre acides aminés et rigidifier les structures protéiques aboutissant à une perte de leur activité biologique (Rihn *et al*., 2001) ;
- **L'acide peracétique** de plus en plus utilisé dans les hôpitaux et qui tend à remplacer le glutaraldéhyde. Il n'existe pratiquement pas à l'état pur et se présente sous forme de solution aqueuse en mélange avec l'acide acétique et le peroxyde d'hydrogène (Bonnard *et al*., 2001).

Parmi les désinfectants utilisés de façon restreinte, on peut citer :

- **Les produits à base d'alcool** (mélangé avec de l'eau). Grâce à l'eau, l'alcool franchit les parois de la cellule et pénètre dans les bactéries où il dénature les protéines cytoplasmiques et membranaires, induit ainsi une inhibition des fonctions enzymatiques, une altération des membranes et entraîne une coagulation cytoplasmique qui tue la bactérie (Rihn *et al.*, 2001) ;
- **Les dérivés iodés halogénés** qui agissent en oxydant les acides aminés aromatiques des protéines, induisant une inhibition de certaines enzymes et une modification des protéines structurelles (Russell & Hugo, 2004) ;
- **Les sels ammoniums quaternaires** qui ont à la fois un pouvoir détergent et un pouvoir désinfectant. Ils se lient aux groupes phosphates et aux chaînes d'acides gras des lipides de la membrane cellulaire qu'ils altèrent, créant une fuite des constituants cellulaires et une coagulation cytoplasmique (Russell & Hugo, 2004) ;

- **Les dérivés phénoliques** qui dénaturent les protéines cytoplasmiques et membranaires et induisent ainsi une inhibition des fonctions enzymatiques, une altération des membranes et entraînent une coagulation cytoplasmique (Russell & Hugo, 2004). Ils ont un très bon pouvoir désinfectant mais ne sont pas biodégradables. Dans le cas d'une désinfection préalable de l'eau par le chlore ou ses dérivés, les substances phénoliques peuvent générer des composés toxiques tels que les chlorophénols.

I.3.2.c. Les résidus médicamenteux

Après ingestion, les composés pharmaceutiques sont distribués dans l'organisme par la circulation sanguine et subissent pour la plupart des biotransformations chimiques au niveau des tissus cibles pour être actif. Cette phase de métabolisation donne naissance à des métabolites, plus ou moins réactifs selon la nature de la molécule, entrainant des effets biologiques et toxiques. Finalement, leur élimination peut se faire par voie biliaire ou rénale, dont la majorité de la dose administrée est retrouvée en 24 h dans les urines sous formes de métabolite (Rabiet, 2006). Il est tout de même important de rappeler que le taux d'excrétion peut varier avec la constitution physique des patients, la nature du médicaments, la posologie ou encore le mode d'administration (Kümmerer *et al*., 1997). Une synthèse rédigée par Rabiet (2006) a permis de mettre en évidence près de 3 300 composés à visés humaines actuellement utilisés en Europe. Après les effluents domestiques, les effluents hospitaliers représentent également une source importante de substances bioactives (Chapman, 2006). Parmi ces molécules on peut citer les analgésiques, antibiotiques, anti-épileptiques, bêtabloquants, anti-cholestérols, anticancéreux, les radio-isotopes ou encore les solvants (Kümmerer, 2001 ; Heberer, 2002 ; Emmanuel *et al.*, 2005 ; Verlicchi *et al*., 2012).

La communauté européenne interdit actuellement la décharge des produits chimiques et de métabolites ayant des propriétés cancérogènes ou mutagènes potentielles dans le système des eaux usées (Directive du Conseil 80/68 / EWG, 1991 ; directive du Conseil 76/464/EWG, 2000). Pourtant, des agents cytostatiques et de nombreux autres produits pharmaceutiques utilisés de manière complémentaire lors des traitements thérapeutiques y sont présents. Concernant les hôpitaux, la règlementation n'encadre pas les rejets des médicaments autres que les substances radioactives, avec pour conséquence la non-détection ni l'évaluation des résidus en sortie d'établissement. Ce constat nous a amené à nous intéresser plus spécifiquement à ces composés pharmaceutiques rejetés en mélange dans les effluents.

I.4. Problématique des composés pharmaceutiques dans l'environnement

I.4.1. Présence dans les stations d'épuration

La première détection de substances pharmaceutiques dans les STEP date des années 70 (Hignite & Azarnoff, 1977). À partir des années 90, de nombreuses études ont porté sur ces nouvelles substances et ont révélé la présence quasi systématique de toutes les catégories de substances pharmaceutiques dans les effluents issus de STEP à des concentrations allant jusqu'à plusieurs microgrammes par litre (Ternes, 1998 ; Kümmerer, 2001 ; Kolpin *et al*., 2002 ; Fent *et al*., 2006 ;

Moldovan, 2006 ; Coquery *et al*., 2007). Les composés les plus fréquemment détectés sont des antibiotiques, antiépileptiques, antiphlogistiques, produits de contraste, régulateurs de lipides, bétabloquants et tranquillisants (Ternes & Joss, 2006).

Mais les procédés conventionnels d'épuration n'apparaissent pas toujours suffisants à leur dégradation (Ternes, 1998). En effet, bien que la plupart de ces composés soient éliminés par adsorption (Carabineiro *et al.*, 2011) ou biodégradés, certaines molécules sont directement rejetés dans l'environnement (Gartiser *et al.*, 1996 ; Kuemmerer *et al.*, 1997 ; Besse *et al.*, 2012).

Halling-Sorensen *et al.* (1998) suggèrent trois devenirs possibles de ces composés et de leurs métabolites dans les STEP :

1. Minéralisation complète avec la production de CO_2 et d'eau comme produits finaux de transformation.
2. Rétention des médicaments par la phase solide (boues/bio-solides) si les composés ou les produits de transformation sont lipophiles.
3. Décharge de ces composés dans les eaux réceptrices sous forme inchangée ou sous forme de produit de dégradation (métabolite).

De plus, l'efficacité d'épuration en STEP est très variable et dépendant du type de traitement. Dans le cas des STEP biologiques par exemple, les taux d'abattement peuvent atteindre des valeurs supérieures à 90 % pour la plupart des anti-inflammatoires et des analgésiques (Besse & Garric, 2007, 2008), tandis que le bêtabloquant aténolol n'est pas épuré (Coquery *et al.*, 2007). Concernant les molécules cytostatiques, les taux d'abattement sont aussi très variables entre les molécules, avec des valeurs proches de 75 % pour le méthotrexate mais seulement 25 % pour le cyclophosphamide (Catastini *et al.*, 2008). La dégradation des sous-produits est également un sujet de préoccupation puisqu'ils peuvent avoir une toxicité similaire voire supérieure à celle des composés parents (Andreozzi *et al.*, 2004 ; Doll & Frimmel, 2003). C'est le cas par exemple de certaines études de dégradation photochimiques en lumière naturelle qui ont montré l'apparition de dérivés photochimiques plus toxiques que les composés parents (DellaGreca *et al.*, 2004).

I.4.2. Présence dans l'environnement

Les produits pharmaceutiques en tant que contaminants dans l'environnement n'ont pas reçu une attention immédiate de la part de la communauté scientifique et des autorités. Il aura fallu attendre qu'un lien ait pu être établi entre la présence d'éthinylœstradiol et la présence d'effets délétères chez des populations de poissons (Jobling, 2004 ; Kim *et al*., 2007 ; projet Européen KNAPPE, 2006-2008) pour que la problématique des rejets de composés pharmaceutiques soit prise en considération. En parallèle, les progrès des techniques analytiques physico-chimiques a permis la détection de traces de substances médicamenteuses et de leurs dérivés ou métabolites à l'échelle mondiale. Leurs présence a été mise en évidence depuis les STEP ou les boues utilisées en épandage agricole jusqu'aux eaux de surface (Ternes, 1998 ; Ashton *et al*., 2004 ; Wiegel *et al*., 2004), les eaux souterraines (Zuccato *et al*., 2000 ; Kümmerer, 2001 ; Heberer, 2002 ; Carlsson *et al*., 2006 ; Gros *et*

al., 2006), les mers et océans (Buser *et al*., 1998 ; Weigel *et al*., 2002, Palaniyappan *et al*., 2013), ou encore les eaux de boissons (Heberer, 1997, 2002 ; Reddersen *et al*., 2002).

A l'heure actuelle, plus de 300 produits pharmaceutiques de différentes classes thérapeutiques ont été détectés à des concentrations pouvant aller du nanogramme par litre (eaux superficielles douces ou marines, eaux souterraines, eaux de boisson) jusqu'au microgramme par litre dans les effluents et les eaux résiduaires, avec des variations spatio-temporelles dépendant des activités anthropiques (Heberer, 2002 ; Gros *et al.*, 2006). Ces résidus s'ajoutent aux nombreuses substances non médicamenteuses liées aux activités humaines et également présentes dans l'environnement, telles que les produits phytosanitaires, détergents, hydrocarbures, métaux, etc.

Parmi les principales sources de contamination des eaux superficielles on peut citer principalement les effluents domestiques, mais également les effluents hospitaliers, ou encore les usines de fabrication et de conditionnement des médicaments (Besse & Garric, 2007). On peut toutefois noter que la situation est très inégale selon les pays et qu'elle dépend de leur développement socio-économique, de l'accès de leurs populations aux soins ou encore de leurs réglementations. Le tableau 2 regroupe quelques composés parmi ceux le plus souvent retrouvés dans l'environnement.

Groupe	Produits pharmaceutiques
Antibiotiques	Oflaxacin, Chlortétracycline, Oxytétracycline, Streptomycine, Fluméquine, Lincomycine, **Ciprofloxacine**, Trometoprim, Penicilline, Lincomycine, Amoxycilline, Spiramycine, Azithromycine, Clarithromycine, Erythromycine, N4-Acétyl-Sulfamethoxazole, Sulfamethoxazole, Roxithromycine, Sulfamethazine.
Antidépressifs	Mianserin
Tranquilisants	Diazepam
Antiépileptiques	Carbamazepine
Anti-inflammatoires / Analgésiques	Acide Acétylsalicylique (Aspirin), Diclofenac, Ibuprofène, Acetaminophène, Metamizol, Codéine, Indométhacine, Naproxen, Phénazone, Fenoprofen, Paracétamol.
Agents de contraste	Diatrizoate, Iohexol, Iomeprol, Iopanidol, Iopromide, Acide iothalamine, Acide ioxithalamine.
Estrogènes et Hormones	17-b-œstradiol, 17-a-ethinylœstradiol, Diethylstilbestrol, Œstrone, Diéthylstilbestrol acétate, **Tamoxifène**
Beta-bloquants	Metoprolol, Propanolol, Nadolol, Atenolol, Sotalol, Betaxolol
Anticancéreux	**Cyclophosphamide**, Ifosfamide
Diurétiques	Furosemide
Régulateurs lipidiques	Benzofibrate, acide Clofibrique, Fenofibrate, Gemfibrozil

Tableau 2 : Composés pharmaceutiques les plus fréquents dans l'environnement (d'après Halling-Sorensen *et al.*, 1998 ; Daughton & Ternes, 1999 ; Hirsch *et al*, 1999 ; Hernando *et al*., 2006).

De manière générale, deux catégories de sources d'émission peuvent être identifiées :

- Les sources d'émissions diffuses : rejets de substances médicamenteuses et de leurs dérivés dans les urines et les fèces de la population humaine et des animaux de compagnie et d'élevage, ou dans les déchets des usagers (ordures ménagères).
- Les sources d'émissions ponctuelles liées aux rejets de l'industrie chimique fine, de l'industrie pharmaceutique, des établissements de soins, des élevages industriels animaux et piscicoles ou aux épandages des boues de stations d'épuration.

On peut noter que les rejets des établissements de soins représentent une situation particulière en raison du nombre de malades traités, de la quantité et de la diversité des médicaments utilisés notamment des anticancéreux, des anesthésiques, des antibiotiques, des produits de diagnostic, de contraste ou des produits radioactifs. La figure 1 présente les voies possibles de la présence de ces résidus pharmaceutiques dans l'environnement aquatique susceptible de contaminer à terme les eaux de boisson (Heberer, 2002).

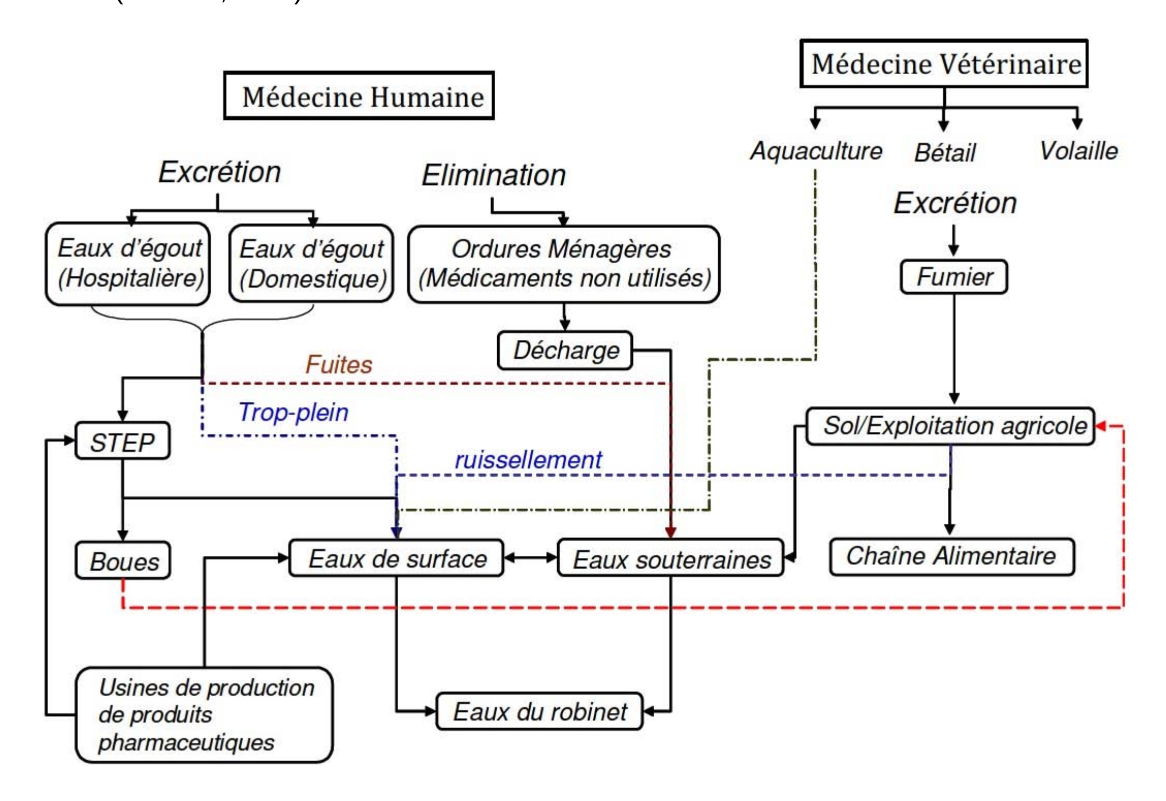


Figure 1 : Sources et voies possibles de la présence de résidus de produits pharmaceutiques dans l'environnement aquatique (d'après Heberer, 2002).

I.4.3. Ecotoxicité

Le risque potentiel associé à la présence de produits pharmaceutiques à des faibles concentrations dans des milieux aquatiques est actuellement au cœur des débats (Pomati *et al.*, 2006). Dans le milieu aquatique, aucune étude *in situ* capable d'évaluer objectivement leurs impacts sur des organismes ou des communautés n'est actuellement disponible (sauf dans le cas des hormones stéroïdiennes), étant donné que ces composés sont habituellement mélangés à d'autres substances actives dans les eaux usées. Par conséquent, les études écotoxicologiques doivent faire

face à un certain nombre de difficultés, et le risque potentiel associé à la présence des mélanges de produits pharmaceutiques dans les eaux de surface reste le plus souvent inconnu. Néanmoins, il ne peut être exclu que la présence continue de molécules pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques et terrestres soit source de danger à long terme (Garric & Ferrari, 2005).

Par opposition à beaucoup de molécules mises sur le marché, les substances médicamenteuses sont spécifiquement conçues pour avoir des effets biologiques (pharmacologiques). Bien que ces substances soient retrouvées dans l'environnement aquatiques à de très faibles concentrations et bien en-dessous des doses thérapeutiques utilisées (Heberer *et al*., 1997 ; Halling-Sorensen *et al*., 1998 ; Ternes, 1998 ; Hirsch *et al*., 1999 ; Stumpf *et al.*, 1999 ; Zuccato *et al*., 2000), elles sont souvent persistantes. De plus elles ont souvent un caractère lipophile leur permettant de se bioaccumuler, et apparaissent suffisantes pour pouvoir engendrer des effets adverses globaux ou spécifiques sur les écosystèmes aquatiques et la santé humaine *via* les eaux de boisson par exemple (Daughton & Ternes, 1999 ; Jorgensen & Halling-Sorensen, 2000 ; Johnson *et al*., 2008 ; Rowney *et al*., 2009 ; Zegura *et al*., 2009).

I.4.3.a. Résistances aux antibiotiques

Les antibiotiques sont des polluants particuliers dans l'environnement qui ont un effet différent des xénobiotiques communs, puisque les bactéries en sont les cibles directes. L'utilisation accrue des antibiotiques ces dernières décennies a causé entre autre une sélection génétique de bactéries plus nuisibles (Jorgensen & Halling-Sorensen, 2000 ; Amenu, 2014). Bien qu'il semble que le développement de résistance aux antibiotiques soit favorisé par la pollution de manière générale (détergeants, désinfectants, etc.), les concentrations d'antibiotiques dans les eaux ou les sédiments peuvent également en être la cause (Attrassi *et al*., 1993 ; Kümmerer & Henninger, 2003 ; da Silva *et al*., 2005 ; Szczepanowski *et al*., 2009). De ce fait, il pourrait par exemple y avoir des conséquences négatives importantes sur la capacité microbiologique des STEP à épurer les effluents. Toutefois, la quantité d'informations disponibles étant encore trop faible, il est difficile de conclure avec certitude de l'impact de ces composés pharmaceutiques sur les populations bactériennes dans l'environnement (Kümmerer *et al*., 2005)

I.4.3.b. Perturbations endocriniennes

D'après la définition proposée en 2002 par l'organisation Mondiale de la Santé, un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation hormonale dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)populations. De manière générale, il s'agit de substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle qui peuvent interférer avec le fonctionnement des glandes endocrines, organes responsables de la sécrétion des hormones. Cette action peut passer par différentes voies :

- Mimétisme d'action d'une hormone naturelle entrainant ainsi la réponse due à cette hormone ;
- Compétitivité au niveau des récepteurs, empêchant la fixation de l'hormone et inhibant ainsi la transmission du signal hormonal ;

- Perturbation de la production ou de la régulation des hormones et/ou de leurs récepteurs.

Certaines hormones, naturelles ou synthétiques, sont connues pour provoquer des effets néfastes sur la santé des organismes aquatiques, même à de très faibles concentrations (Lange *et al*., 2001). Par ailleurs, certains travaux ont également montré que les niveaux d'activité œstrogénique mesurés dans les sédiments pouvaient être jusqu'à 700 fois plus élevés que ceux mesurés dans les eaux de surface du même site. Cela confirme la capacité d'accumulation de ces molécules dans les sédiments (Peck *et al*., 2004).

I.4.3.c. Génotoxicité

Il y a eu un intérêt grandissant ces dernières années pour la recherche des effets génotoxiques liés à la l'exposition à des génotoxines dans l'environnement (Pfohl-Leszkowicz et al 1993 ; Pfohl-Leszkowicz, 1994, 2008). La génotoxicité représente la capacité d'une substance à induire des dommages à l'ADN et aux chromosomes des cellules.

De par leurs caractéristiques chimiques intrinsèques et leurs effets thérapeutiques, de nombreuses substances pharmaceutiques sont génotoxiques. C'est le cas par exemple des molécules cytostatiques utilisées dans le cadre de chimiothérapie (pour une revue, voir Sorsa *et al*., 1985) ou encore des antibiotiques (Ehlhardt *et al.*,1988 ; Giuliani *et al.*, 1996). Du fait qu'un cancer est supposé être provoqér à n'importe quel niveau d'exposition à un composé génotoxique, le risque réside dans l'absence d'une dose seuil en-dessous de laquelle aucun effet cancérogène ne puisse pas se produire (Webb *et al*., 2003). De plus, certaines études ont montré que la toxicité pouvait être influencée par des effets additifs et/ou de synergie (Daughton & Ternes 1999 ; Pomati *et a*l., 2006 , 2007). Ceci soulève des questions concernant la capacité de composés pharmaceutiques potentiellement génotoxiques à induire des altérations génétiques ou mutagènes aux doses environnementales détectées, et notamment lorsqu'elles sont en mélange (Anway *et al*., 2005).

II. Métabolisation des xénobiotiques et cancérogénèse

II.1. Métabolisation des xénobiotiques dans l'organisme

De par notre environnement, nous sommes tous exposés quotidiennement, directement ou indirectement, à des substances exogènes d'origines diverses, rassemblées sous le terme de xénobiotiques. Ces composés regroupent des produits naturels, des médicamentset des polluants de l'environnement: toxines végétales et animales, dérivés des combustibles domestiques et industriels, solvants, colorants, additifs alimentaires, pesticides, herbicides, etc. Ils sont le plus souvent hydrophobes et ont pour tendance naturelle de s'accumuler dans les phases lipidiques des membranes cellulaires. Ils entraîneraient ainsi une mort inéluctable des organismes si ceux-ci ne s'étaient dotés, au cours de l'évolution, de systèmes enzymatiques permettant leur élimination.

L'ensemble des étapes impliquées dans la transformation et l'élimination de ces xénobiotiques est appelé « métabolisation ». Le produit de métabolisation formé est un composé hydrophile dont l'excrétion est favorisée au niveau rénal ou biliaire (Stieger & Meier, 1998) (figure 2).

Ce processus de métabolisation se déroule selon trois phases regroupant différentes enzymes de biotransformation (phases I et II) et des transporteurs (phase III) :

- **Les réactions de phase I :** dites de fonctionnalisation, permettent l'introduction d'une fonction chimique nouvelle (-OH, $-NH_2$, -COOH) rendant la molécule plus polaire. Ces réactions sont généralement des réactions d'oxydation, mais elles comportent également des réactions d'hydrolyse, de réduction et déhalogénation. Cette étape est catalysée par les mono-oxygénases à cytochromes P450 essentiellement, ainsi que par les peroxydases et par la quinone réductase (NQO).
- **Les réactions de phase II :** dites de conjugaison, permettent l'ajout d'un radical hydrophile et sont réalisées soit directement sur le xénobiotique inchangé, soit sur les métabolites "fonctionnalisés" générés lors de la phase I. Ces réactions de conjugaison augmentent l'hydrophilie de la molécule, facilitent son transport et activent son élimination par voies rénale et biliaire. Les radicaux hydrophiles conjugués sont des petites molécules endogènes polaires telles que le glutathion, l'acide glucuronique, le sulfate, les groupements méthyle, acétyle, glycocolle et autres acides aminés. Ces réactions de conjugaison sont catalysées par différentes transférases et notamment par les glutathion-S-transférases (GST), les sulfurotransférases et les UDP-glucuronosyltransférases.
- **Les enzymes de phase III :** permettent l'élimination des conjugués hydrophiles. Ce sont essentiellement des glycoprotéines membranaires permettant le transport actif des xénobiotiques et des conjugués de la phase II hors de la cellule (Silverman, 1999).

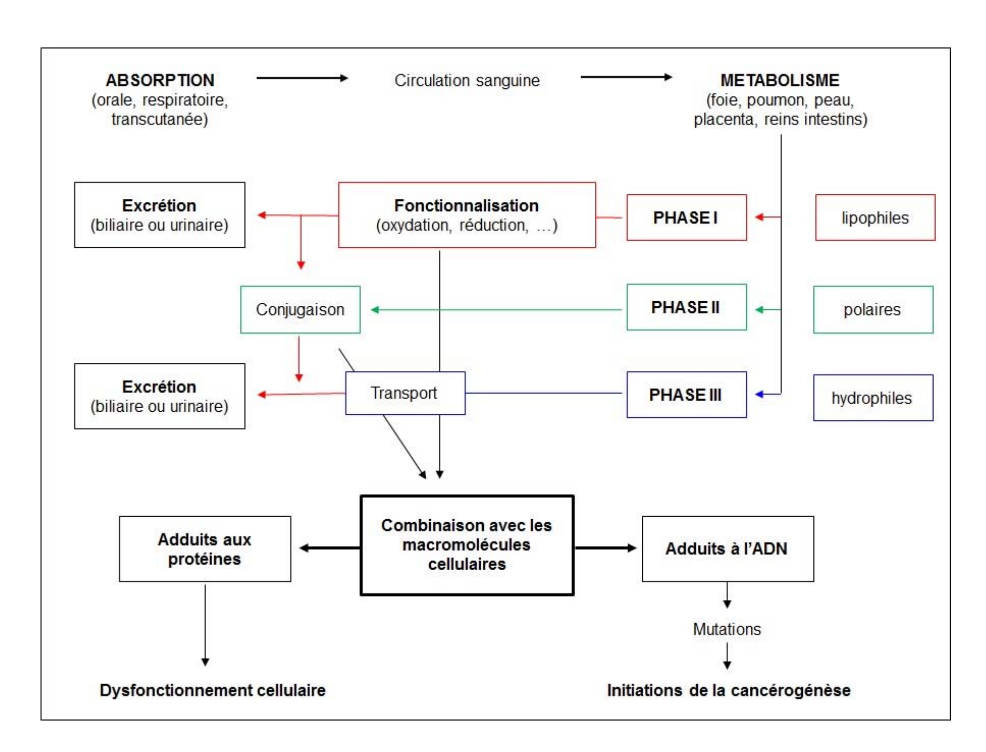


Figure 2 : Schéma général de la biotransformation des xénobiotiques (sources diverses).

Toutefois, la métabolisation des xénobiotiques ne conduit pas toujours à une détoxication. Dans certains cas le produit oxydé ou réduit formé peut manifester une très forte réactivité avec les macromolécules nucléophiles telles que les protéines ou les acides nucléiques. Les lésions qui en

découlent (cassures à l'ADN, adduits à l'ADN, etc.) peuvent entraîner l'apparition de mutations ponctuelles et initier des processus de cancérogenèse. La formation d'adduits aux protéines peut également entraîner une nécrose tissulaire ou des phénomènes d'allergies (Dansette *et al*., 1998).

II.1.1. Les mono-oxygénase à cytochrome P450

II.1.1.a. Localisation et distribution

Les cytochromes P450 (CYP) constituent une superfamille de 57 gènes codant des enzymes qui métabolisent des substances endogènes (stéroïdes, eicosanoïdes, vitamines, etc.) mais également un grand nombre de médicaments. Ces enzymes jouent un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques, dont les médicaments, et ont un rôle primordial dans la protection de l'organisme contre les agressions extérieures (polluants, pesticides, etc). Parmi un grand nombre de réactions possible, la plus importante est l'hydroxylation.

Les CYPs sont présents essentiellement au niveau hépatique, mais on peut également les retrouver en quantité non négligeable dans les reins (zone corticale), les poumons, l'intestin, la peau, le cerveau, la vessie, les glandes surrénales, etc. (De Waziers *et al*., 1990 ; Trédaniel *et al*., 1995 ; Hukkanen, 2000). Leur activité est dépendante du génotype et de l'environnement (Hietanen *et al*., 1997), et les propriétés catalytiques d'oxydation et de réduction varient en fonction de la nature de leur partie protéique (apoprotéine). Il existe aussi une distribution différente des cytochromes P450 entre les organes pour une même espèce (Mugford & Kedderis, 1998).

Chez les mammifères, les propriétés connues des CYPs peuven têtre résumées comme suit :

- Ils sont formés d'environ 500 acides aminés : une cystéine localisée près de la région carboxy-terminale de la protéine qui permet la liaison thiol-ligand et une région N-terminale riche en AA hydrophobes qui permet la fixation de la protéine aux membranes ;
- Ils sont appelées mono-oxygénases, car ils incorporent un atome d'oxygène à partir d'oxygène moléculaire et transforment ainsi une grande variété de composés chimiques.
- Ils sont plus concentrés dans les tissus tels que le foie, l'intestin et les glandes surrénales par rapport aux autres hémoprotéines.
- Ils ont habituellement une expression ubiquitaire, bien que certains tissus n'expriment de manière constitutive que certaines isoformes ;
- Ils sont pour la plupart régulés par des facteurs de transcription qui sont activés par différents composés chimiques. La capacité d'un composé à servir d'inducteur est généralement liée à une famille de CYP.

II.1.1.b. Structure

Les mono-oxygénases à cytochromes P450 (CYP), aussi appelées oxydases à fonctions multiples (MFO), sont des complexes multi-enzymatiques associés à la membrane externe du réticulum endoplasmique et des mitochondries (membrane interne, externe ou matrice). Leur site actif est orienté du côté du cytoplasme (Anandatheerthavarada *et al*., 1997).

Les composants du système MFO sont au nombre de 5 :

- **le cytochrome P450 :** hémoprotéine possédant au niveau du site catalytique un noyau protoporphyrine à atome de fer central, et une protéine (apoprotéine) qui lui ménage une cavité hydrophobe.
- **la NADPH-cytochrome c (P450) réductase :** flavoprotéine qui possède une partie hydrophobe se liant à la membrane du réticulum endoplasmique. Elle fait partie intégrante du système monooxygénasique, mais dans certaines conditions elle peut elle-même catalyser la réduction de certains xénobiotiquesau niveau du foie.
- **le cytochrome b5 :** protéine héminique ayant sa partie N terminale hydrophobe qui contribue au transfert d'électron à partir de NADPH et de NADH.
- **la NADH-cytochrome b5 réductase :** flavoprotéine à partie terminale hydrophobe. Cette enzyme ne semble pas être indispensable au fonctionnement de tous les cytochromes P450.
- **la phosphatidylcholine :** phosphoglycéride agissant comme transporteur d'électrons du cofacteur (NADPH) au complexe cytochrome P450-substrat et facilitant l'interaction d'un substrat liposoluble à l'hémoprotéine.

II.1.1.c. Classification et nomenclature des cytochromes P450

La purification et le séquençage de nombreux CYP ont été réalisés dans différents laboratoires. Il existe plus de 3 000 séquences de gènes de CYP connus appartenant à toutes les espèces. Chez l'homme, 57 gènes et 47 pseudogènes ont été séquencés (http://drnelson.utmem.edu/Cytochrome P450.html).

Dans le système des mono-oxygénases, la variété des propriétés catalytiques trouve son origine dans la diversité de structure de la partie apoprotéique du cytochrome P450. Selon le degré d'homologie entre les séquences primaires des acides aminés constitutifs, les critères phylogénétiques et l'organisation génétique, les cytochromes P450 ont été répartis en familles et sous-familles (Nebert *et al*., 1987). La nomenclature actuelle des cytochromes P450 consiste à nommer un gène ou un ADNc par le symbole CYP, suivi d'un chiffre arabe désignant la famille, d'une lettre majuscule désignant la sous-famille, puis d'un chiffre arabe pour chaque gène (Nelson *et al*., 1996). Pour désigner l'ARN_m ou la protéine, la même nomenclature est employée sans l'attribut italique. En règle générale, les CYPs appartenant à une même famille possèdent plus de 40 % d'homologie de séquence et à l'intérieur d'une même sous-famille, l'identité peut être supérieure à 55 %. Les gènes appartenant à une même sous-famille sont groupés sur un même chromosome en clusters.

II.1.1.d. Implication dans la métabolisation des xénobiotiques

En présence de substrat exogène, les CYPs catalysent un très grand nombre de biotransformations (figure 3), qui se distinguent principalement par l'activité biologique éventuelle du produit obtenu. Dans la plupart des cas, ceci permet de faciliter l'élimination du composé initial par l'ajout de groupements polaires. Une étape de conjugaison vient éventuellement parachever ce mécanisme de détoxication, initié par le CYP.

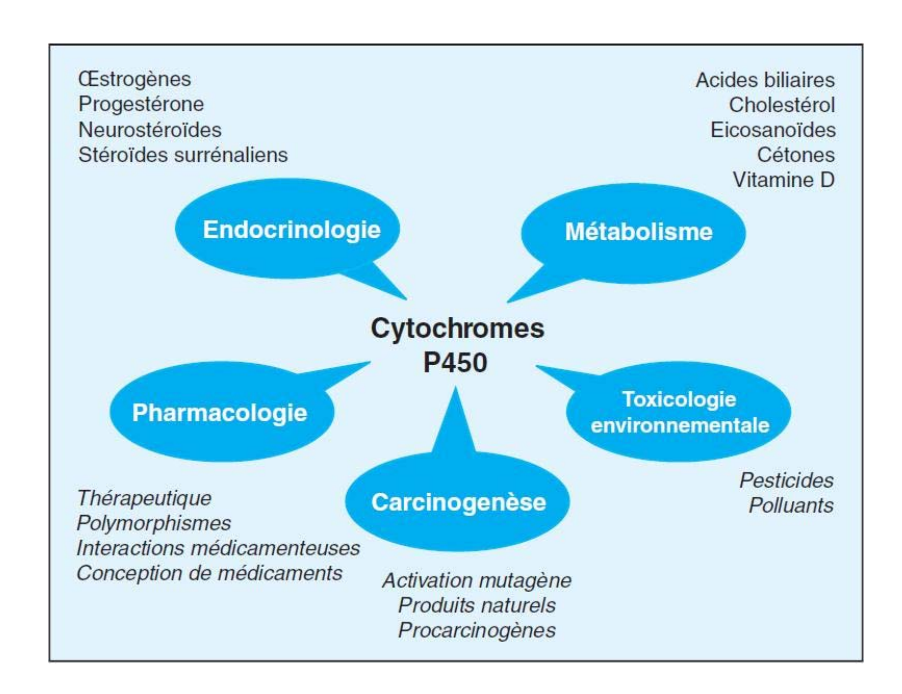


Figure 3 : Implications physiologiques et physiopathologiques des cytochromes P450 (Gueguen *et al*., 2006).

Les mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP) sont essentielles dans les phénomènes de biotransformation de substances physiologiques (stéroïdes, acides biliaires, vitamine D, acides gras, prostanglandines, leucotriènes, rétinoïdes, amines biogènes, etc) (tableau 3). Les CYPs des familles 1-4 sont localisés dans le foie et peuvent être impliqués dans la phase I du métabolisme des médicaments et d'autres composés étrangers à l'organisme, bien que leur rôle premier soit la métabolisation des substances endogènes. Les proportions des différents CYPs au niveau du foie sont connues : le CYP3A4 (20 à 50 %), le CYP2C8/9 (10 à 30 %), le CYP2D6 (2 à 6 %), le CYP2C19 (1 à 10 %), le CYP1A2 (1 à 13 %), le CYP2E1 (7 %) ainsi que les CYP2A6, et 4A (Hasler, 1999 ; Lewis, 2004). Ces CYPs représentent à eux seuls plus de 90 % des enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif des médicaments.

Bien que la plupart des organismes vivants (animal, plante, champignons) possèdent ces systèmes de métabolisation, leurs variétés ainsi que leur taux d'expression diffèrent selon les espèces. De manière générale, des intermédiaires électrophiles apparaissent suite à la métabolisation et peuvent former des adduits covalents aux bases de l'ADN. Un xénobiotique présente souvent la propriété d'induire les enzymes qui permettent son métabolisme. La complexité des phénomènes d'induction des enzymes du métabolisme fait qu'il existe un équilibre entre l'activation métabolique et la détoxication du xénobiotique. Cela détermine le degré de la réponse toxique, et notamment génotoxique. Ainsi, les CYP3A4 et 1A2 qui métabolisent l'Aflatoxine B1 en composé procarcinogène chez l'Homme (Aoyama *et al.,* 1990), mais la cancérogenèse hépatique de l'Aflatoxine B1 chez la truite arc-en-ciel, peut être inhibée par la β-Naphtoflavone, inducteur du CYP1A (Takahashi *et al*., 1996). Un autre exemple est la formation d'adduits aux hydrocarbures polycycliques aromatiques qui diffèrent entre le rat, le poisson et les plantes (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1996).

Cytochrome P450	Fonctions métaboliques
CYP 1	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP 2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP 3	Métabolisme des xénobiotiques, des stéroïdes et des médicaments
CYP 4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP 5	Thromboxane A2 synthase
CYP 7	Synthèse des acides biliaires
CYP 8	Synthèse des acides biliaires Prostacycline synthase
CYP 11	Stéroïdogenèse
CYP 17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP 19	Aromatase (synthèse des oestrogènes)
CYP 21	Stéroïdogenèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP 24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP 26	Hydroxylation de l'acide rétinoïque
CYP 27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP 39	7α-hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP 46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP 51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

Tableau 3 : Fonctions métaboliques des cytochromes P450.

II.1.2. Les peroxydases

II.1.2.a. Localisation et fonctions

Les peroxydases sont des enzymes héminiques capables de catalyser des réactions durant lesquelles l'eau oxygénée générée dans la cellule par un stress oxydatif est réduit et un substrat oxydé. Ces protéines sont présentes dans tous les règnes et forment généralement des familles multigéniques de taille variables (de 2 à 138 isoformes). De manière générale, on distingue plusieurs types de peroxydase, sous divisés en plusieurs familles de protéines :

<u>Les peroxydases à hème :</u>

- famille des cyclooxygénases (ex : prostaglandines H synthases) dont :
  - la COX 1 (ou PGHS-1), exprimée constitutivement dans la plupart des tissus où elle participe au maintien de l'homéostasie cellulaire (Garavito & DeWitt, 1999).
  - la COX2 (ou PGHS-2), exprimée constitutivement seulement dans quelques tissus tels que le cerveau, la prostate, la moelle épinière, les reins et tissus pathologiques

comme les cellules cancéreuses du colon entre autres (Simmons *et al*., 1991 ; Harris *et al*., 1994 ; Breder *et al*., 1995).

- peroxydase à 2 hèmes (ex : cytochromes C) ;
- famille des catalases ;
- famille des peroxydases DyP-type, très répandues chez les bactéries et champignons ;
- peroxydases de classe I (ex : ascorbate peroxydase, cytochrome C peroxydase) ;
- peroxydases de classe II (ex : lignine peroxydase).

Les peroxydases sans hème :

- famille des alkylperoxydases D et assimilées ;
- haloperoxydases (ex : manganèse catalase) ;
- glutathione peroxydase ;
- peroxyrédoxines (ex : peroxyrédoxines) ;
- NAD(P)H oxydases (ex : NADPH oxydases, déshydrogénase).

II.1.2.b. Implication dans la métabolisation des xénobiotiques

La bioactivation de xénobiotiques par l'activité peroxydase de la COX représente les cas les plus importants dans la cellule. Elle sert d'enzyme d'activation métabolique en complément ou en remplacement des mono-oxygénases à cytochromes P450 dans des réactions de bioactivation *in vivo* (Degen, 1993). Un certain nombre de composés chimiques peuvent être oxydés soit directement par la peroxydase de la COX, soit par des radicaux peroxylés générés lors de la réaction de cette enzyme. Par exemple, plusieurs amines aromatiques ou phénols tels que les œstrogènes stéroïdiens ou encore l'hydroquinone (métabolite du benzène) sont oxydés *in vitro* par les peroxydases (Degen *et al*., 1982 ; Schlosser *et al*., 1990). Ces métabolites peuvent réagir avec des protéines et des acides nucléiques et induire des effets délétères sur la cellule à l'origine de cancers. Ce type de mécanisme a été mis en évidence au laboratoire avec une toxine alimentaire, l'Ochratoxine A (Pinelli *et al*, 1999 ; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2008).

L'implication de ces enzymes dans la métabolisation peut jouer un rôle prépondérant dans l'apparition de cancer. C'est le cas notamment de la surexpression de la COX2 qui semble être impliquée dans la formation de certains cancers comme celui du colon (Prescott & Fitzpatrick, 2000) ou des voies urinaires (Williams *et al*., 1999 ; Khan *et al.,* 2000 ; Majima *et al*., 2003). L'implication des COX2 dans le processus de cancérogenèse se ferait soit en réprimant la voie de l'apoptose conduisant à la mort cellulaire, soit en participant à la croissance et à la différenciation cellulaire au travers de la production de prostaglandines (pour un article général voir Prescott & Fitzpatrick, 2000).

II.1.3. Les glutathion-S-transférases

II.1.3.a. Localisation et fonction

Les Glutathion S-transférases (GSTs) représentent une famille enzymatique de phase II présentes chez les eucaryotes et les procaryotes, dont la fonction est principalement détoxifiante (lutte contre le stress oxydatif). Chez l'Homme, il existe au moins 20 isoenzymes de GST cytosoliques, classées en 5 familles : GST de classe alpha, mu, pi, sigma, et theta (Miller *et al*., 1997). De plus, il existe deux types de GST, les unes membranaires, les autres microsomales dont les leucotriènes C4 synthases (LTC4S) (Otieno *et al*., 1997).

II.1.3.b. Implications dans le métabolisme des xénobiotiques.

Les GST possèdent principalement deux activités (Hayes & Pulford, 1995):

- Conjuguer des composés électrophiles endogènes / exogènes par formation d'un pont thioether avec le glutathion réduit. Les produits peuvent être excrétés dans la bile ou transportés dans le rein où ils sont métabolisés en acide mercapturique, puis excrétés dans l'urine.
- Protéger la cellule par leur activité peroxydasique, qui consiste à réduire les peroxydes organiques en composés moins réactifs (Ketterer *et al*., 1990).

Elles métabolisent, entre autres, des cancérogènes, des polluants environnementaux, des médicaments chimiothérapeutiques, des produits provenant du stress oxydatif et des substances endogènes comme le leucotriène A4 et la prostaglandine H2 (Hayes & Pulford, 1995). Toutefois, bien que la conjugaison au glutathion soit un processus détoxifiant, dans certains cas elle peut accentuer la toxicité des xénobiotiques et activer des procarcinogènes (Seidegard & Ekstrom, 1997 ; Monks *et al.*, 1990). Quatre mécanismes sont à l'origine de cette toxification, entraînant la formation de :

- Quinones, thiocyanates etnitrosoguanidine, suite à une déhalogénation des alcanes ou alcènes halogénés ;
- Ions épisulfonium électrophiles à partir d'alcane dihalogénés;
- Dérivés néphrotoxiques suite à l'action de la β-lyase dans le rein ;
- Dérivés de quinones, quinone-imines ou isothiocyanates pouvant provenir de l'action de la γ-glutamyltranspeptidase dans le rein.

II.2. Interactionsentre les xénobiotiques dans l'organisme

Les xénobiotiques ne présentent pas tous le même degré de toxicité, qui peut être faible ou fort, et qui s'explique par les différences entre les structures chimiques des substances. Ces différences peuvent affecter leurs capacités à perturber le fonctionnement de l'organisme.

A l'heure actuelle, l'évaluation du risque (éco)toxicologique est centrée sur une substance unique et l'évaluation des mélanges représente un véritable changement de paradigme. L'US EPA (2003) a proposé une évaluation du risque cumulé en trois étapes. La première phase est une phase de planification et de formulation du problème. La seconde phase est celle de l'analyse, qui intègre les

données sur les dangers, l'exposition, les doses réponses de chaque substance isolée, et sur leur mélange (interactions des agents de stress, toxicité chimique conjointe). Ces renseignements constituent la clé pour l'évaluation de la toxicité des mélanges (Callahan & Sexton, 2007). La dernière phase est celle de l'interprétation et de la caractérisation du risque.

Une des premières démarches concernant une action conjointe entre les molécules, selon que le mode d'action soit différent ou non et qu'il y ait interaction ou non, se basait sur des modèles de mélanges binaires (Plackett & Hewlett, 1952). Or, les polluants sont rarement en mélange binaire dans l'environnement. D'autres méthodes de détermination des effets toxiques ont depuis été proposées pour mieux caractériser les phénomènes observés, mais il n'existe pas de solutions idéales et d'application immédiate (Borgert *et al.*, 2004). La prédiction de la toxicité des mélanges est d'autant plus complexe que les effets dépendent de la concentration de chaque constituant, de la durée d'exposition, de la séquence d'administration, de la susceptibilité individuelle, etc.

De manière générale, on note 5 types d'interactions possibles (tableau 4) :

- **Effet d'antagonisme :** survient lorsque les effets combinés d'au moins deux composés est moins toxique que les effets individuels de chaque substances, ou lorsque l'effet du mélange aboutit à une inversion de la réponse de toxicité.
- **Effet d'additivité :** survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux produits chimiques est égal à la somme des effets de chaque produit individuel (aucune interaction directe entre molécules).
- **Effet de potentialisation :** survient lorsqu'une substance qui n'a pas d'effet toxique est combinée à un produit chimique, et a pour effet de rendre ce dernier beaucoup plus toxique.
- **Effet de synergie :** phénomène par lequel plusieurs facteurs agissant ensemble créent un effet plus grand que la somme des effets attendus s'ils avaient opéré indépendamment.
- **Effet d'action coalitive :** survient lorsque chacune des substances prises individuellement ne produit pas d'effets toxiques, mais que leur combinaison est toxique.

Interaction	Modèle	Effet toxique
Antagonisme	2 + 3 < 5	Diminution / Effet inverse
Addition	2 + 3 = 5	Aucune interaction
Synergie	2 + 3 > 5	Augmentation
Potentialisation	0 + 3 > 3	Amplification
Action coalitive	0 + 0 = 4	Révélation d'un effet

Tableau 4 : Types d'interactions possibles dans les mélanges de molécules.

II.3. Notion générale de cancérogénèse

Bien que suite à des études épidémiologiques des associations aient été observées entre certains composés chimiques et la cancérogenèse humaine dès le 18ème siècle, l'étude des interactions de ces composés avec les constituants cellulaires n'a démarré qu'en 1947, quand Miller & Miller ont montré la liaison de ces agents aux protéines. Ils présumaient plus tard que tous les

cancérogènes agissaient par des mécanismes similaires, opérant comme des électrophiles (Miller & Miller, 1979) pour produire des mutations (Ames *et al.*, 1973). Cependant, Weisburger & Williams (1981) introduisent une distinction entre les cancérogènes génotoxiques et cancérogènes épigénétiques (non génotoxiques) (figure 4) :

Les cancérogènes génotoxiques (nitrosamines, amines aromatiques, HAP, etc.) ont dans leur structure des groupes électrophiles très réactifs qui peuventformer des adduits à l'ADN (Miller, 1970 ; Miller & Miller, 1981). Bien que ces cancérogènes aient une action directe sur l'ADN, des mécanismes épigénétiques peuvent avoir lieu. Une exposition chronique à des faibles doses peut contribuer à des altérations non génotoxiques ayant un effet promoteur sur les clones cellulaires transformés *in vivo* (Luch, 2005).

Les cancérogènes épigénétiques, de part leur structure chimique, ne forment pas directement des composés électrophilespouvant créer des adduits à l'ADN. Ils agissent sur transformation néoplasique des cellules en agissant sur les oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeur. Ils affectent la transformation en augmentant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'oxyde d'azote et les produits de la lipo-peroxydation qui ont eux le potentiel de modifier l'ADN, notamment des cassures à l'origine de mutations (Kawanishi *et al.*, 2002 ; Williams & Jeffrey, 2000). Ceci va interférer avec le processus de réparation de l'ADN ou le contrôle du cycle cellulaire (Hartwig & Schwerdtle, 2002 ; McMurray & Tainer, 2003 ; Hughes, 2002). Ils peuvent également affecter la méthylation de l'ADN ou encore l'acétylation des histones (Bombail *et al.*, 2004) qui sont aussi des phénomènes primordiaux dans l'expression des gènes et le cycle cellulaire.

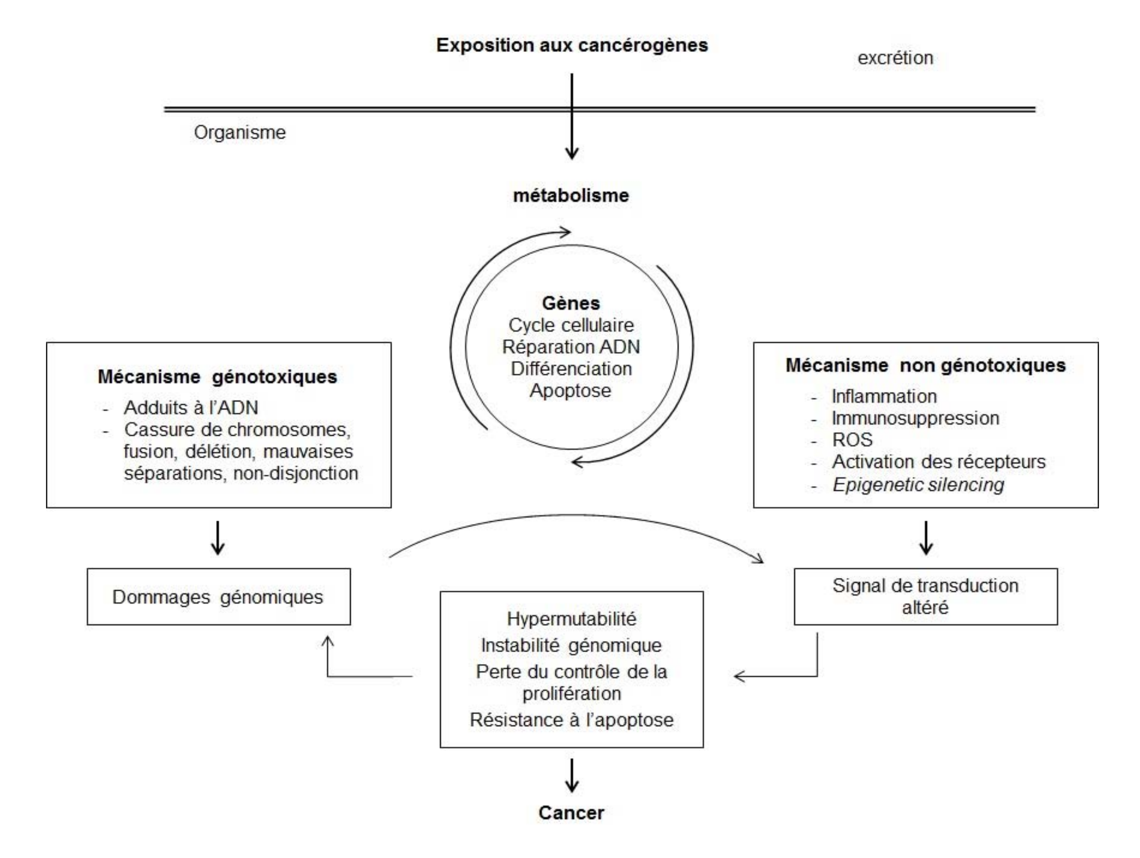


Figure 4 : Vue générale des différents modes d'action des cancérogènes chimiques génotoxiques et épigénétiques (d'après Luch, 2005).

II.3.1. Les étapes de la cancérogenèse

Parmi les phénomènes provoquant l'apparition du cancer, l'intervention de substances chimiques tels que les composés pharmaceutiques exogènes tient une place importante. L'apparition d'un cancer au niveau individuel résulte d'une interaction complexe entre des facteurs exogènes de nature environnementale et des facteurs endogènes, génétiques ou acquis. Le processus de la cancérogenèse est caractérisé par quatre phases successives (figure 5) :

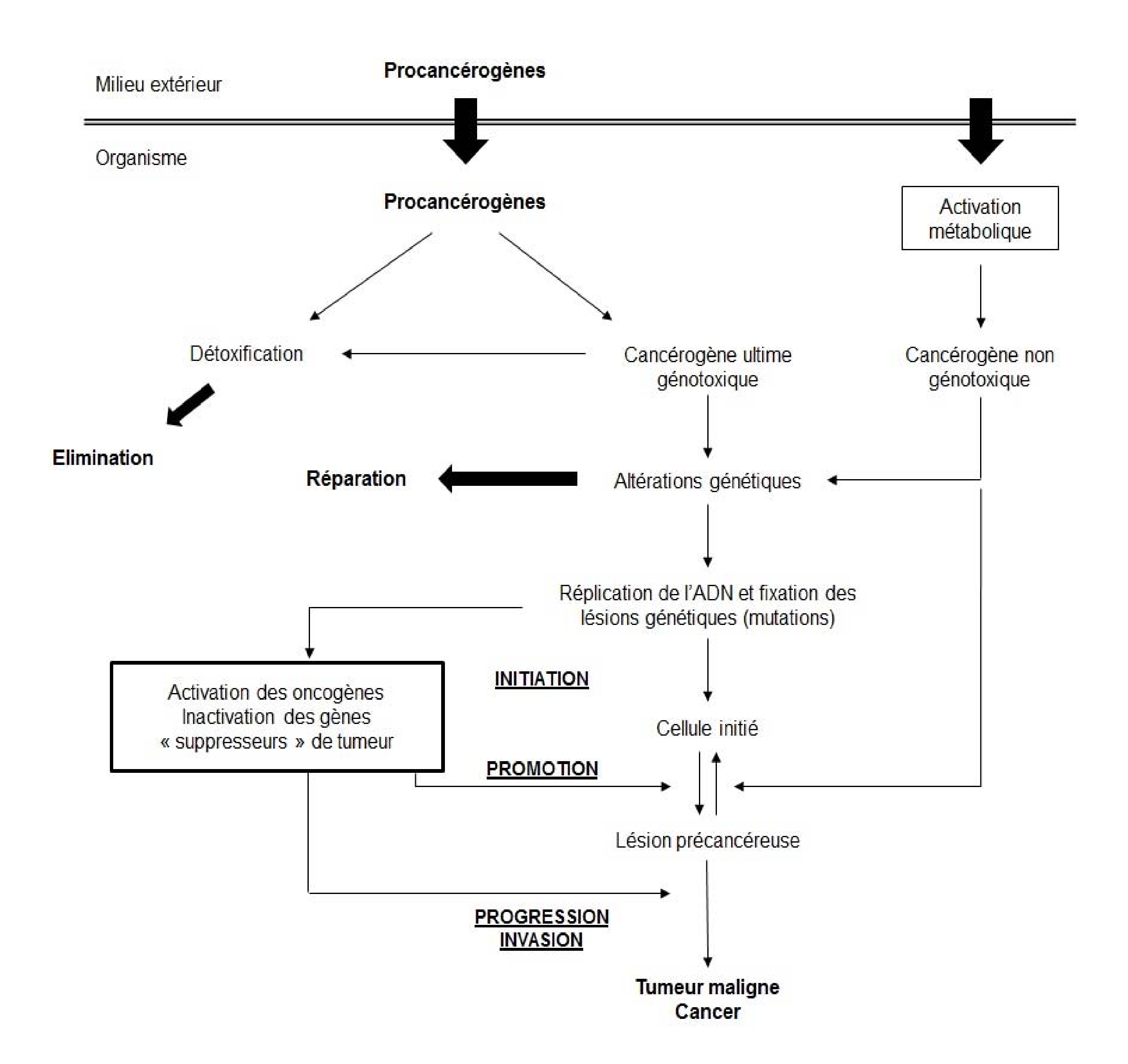


Figure 5 : Les principales étapes de la cancérogénèse chimique.

- **L'initiation**, qui consiste à transformer une cellule normale en cellule "initiée" à travers le développement de défauts génétiques. L'initiation tumorale est une étape irréversible qui passe par une exposition à un agent initiateur chimique, physique (U.V, radiations) ou viral appelé cancérogène. Les altérations du matériel génétique sont de différents types selon qu'il s'agit de mutations, d'aberrations chromosomiques ou de dommages primaires de l'ADN. Si cette altération est stabilisée après une ou deux réplications cellulaires, les cellules sont alors dites "initiées".

- **La promotion**, qui permet aux cellules initiées d'acquérir la faculté de proliférer de façon autonome, ce qui conduit à la formation des lésions pré-néoplasiques (tumeurs bénignes). La phase de promotion tumorale se distingue de la phase d'initiation par plusieurs caractères dont la réversibilité (le retrait de la substance promotrice peut entraîner la régression des lésions précancéreuses dans certains cas). Bien que les mécanismes impliqués dans la promotion tumorale soit encore mal connus, des perturbations dans les mécanismes de signalisation cellulaire (surexpression d'oncogènes par exemple) pourrait entre autre jouer un rôle essentiel (Weinstein, 1988).

- **La progression**, qui est caractérisée par le passage d'une lésion pré-néoplasique à un néoplasme (tumeur maligne). Cette phase présente une grande instabilité génomique faisant appel à des remaniements de gènes et/ou de chromosomes, à des translocations, des recombinaisons, des amplifications de gènes. Des mutations d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs sont également impliquées dans cette étape de progression.

- **L'invasion**, qui est le processus final de cancérogenèse, stade où les cellules de la tumeur maligne s'infiltrent dans les tissus voisins. Ces cellules peuvent également migrer *via* la circulation sanguine ou lymphatique vers d'autres tissus de l'organisme, se fixer puis développer des métastases (Boyer *et al*., 1999).

II.3.2. Mécanismes moléculaires de la cancérogénèse

La cancérogenèse est multi-séquentielle et est associée à une accumulation d'altérations génétiques. Les mutations critiques impliquées dans la transformation ont lieu dans les gènes de contrôle de la croissance, les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur et ceux contrôlant les gènes suppresseurs de tumeur (Hussein & Harris, 1998). La plupart des gènes altérés identifiés jusqu'à présent appartiennent à deux familles : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur (Harris, 1991).

Les proto-oncogènes (ras, fos, jun, etc.) sont des gènes qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de la croissance et /ou de la différenciation cellulaire. Ils codent notamment des éléments de transduction de signaux mitogènes. Lorsqu'ils sont activés par des mutations, ils deviennent des oncogènes, c'est à dire qu'ils contribuent au passage des cellules d'un phénotype normal à un phénotype cancéreux.

La perturbation de ces gènes engendre la différenciation, la croissance et la coordination cellulaire anarchique qui caractérisent les cellules cancéreuses. Les gènes suppresseurs de tumeur n'activent pas la prolifération cellulaire mais au contraire l'inhibent. L'un d'eux, le gène P53 codant la protéine p53, joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, ainsi que dans le contrôle de la réplication de l'ADN et de la différentiation cellulaire (figure 6).

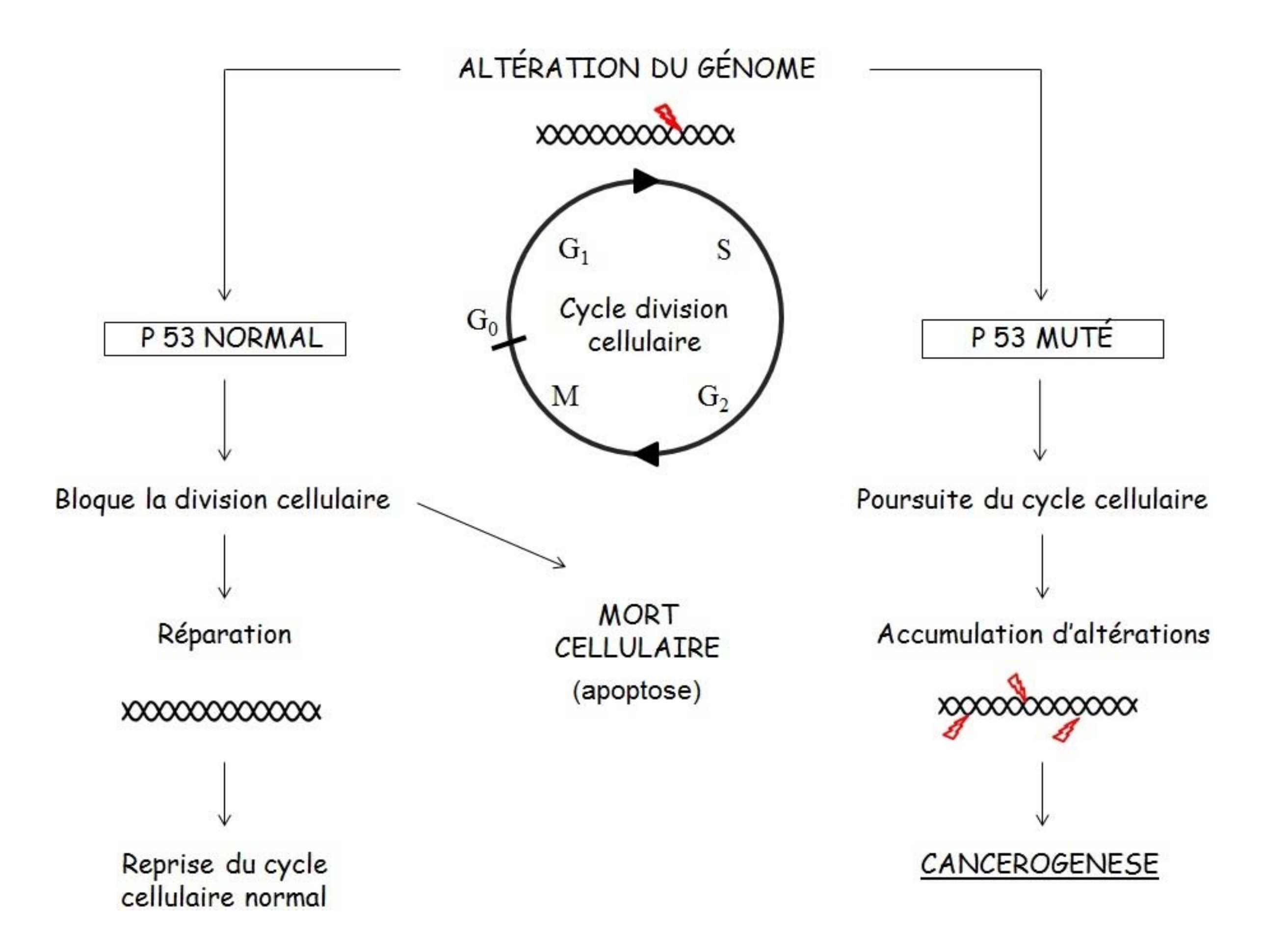


Figure 6 : Implication du gène P53 dans la mise en place de la cancérogénèse.

II.3.3. Molécules pharmaceutiques retenues pour l'étude

Au cours de l'étude nous avons choisi de retenir trois classes de molécules pharmaceutiques, afin de représenter de manière pertinente l'état actuel de la contamination des milieux aquatiques. De par leurs caractéristiques chimiques intrinsèques, ainsi que leur présence récurrente dans l'environnement, ces médicaments (antibiotique, modulateur hormonal, anticancéreux) représentent un risque non négligeable dans l'apparition de processus de cancérogénèse chez des individus exposés de manière chronique à de faibles doses.

II.3.3.a. Tableau de synthèse générale

	Cyclophosphamide	Tamoxifène	Ciprofloxacine
Synonymes	► Endoxan ► Cytoxan ► Neosar ► Procytox ► Revimmune ► N-bis(2-chloroethyl)-1,3,2-oxazaphosphinan-2-amine 2-oxide	► Kessar ► Noltam ► Nolvadex ► Tamofen ► Tamoxasta ► Tamoxifen citrate ► Z-Tamoxifen citrate ► Terimon ► Zynoplex	►Ciproflox ► Ciloxan ► Ciprobay ► Ciprobid ► Euciprin ► Cipro IV- 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-14-dihydro-3-quinolinecarboxylique acid
Formule chimique	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	$C_{26}H_{29}NO$	$C_{17}H_{18}FN_30_3$
Numéro CAS	85721-33-1	54965-24-1	50-18-0
Aspect	Poudre blanche	Poudre blanche	Poudre légèrement jaune
Poids moléculaire	261,1 g/mol	563,62g/mol	331,38g/mol
Temps de ½ vie	3 – 12 heures	5 – 7 jours	4 – 7 heures
Point de fusion	65 - 66°C	97°C	255 – 257°C
Biotransformation	Hépatique	Hépatique	Hépatique
% de liaison protéique	> 60%	N/A	20 – 40%
Solubilité	● Soluble dans l'eau (1 :25) et l'éthanol ● Légèrement soluble dans Benzène – Éthylène glycol – tétrachloride de carbone et de dioxan ● Peu soluble dans Éther éthylique – Acétone	● 0,5mg/L dans l'eau à 37°C ● HCl à 0,02N : 0,2mg/L	● 1,1mg/L dans l'eau à 37°C
Log K_{OW}	0,63	6,3	- 1,74
pKa	12,78	8,76	5,76
Remarques	Chimiquement stable pour de longue période (28 jours à 4°C) / Instable en solution alcaline (pH>9,11)	Chimiquement stable à forte concentration (mg/L) pour une période maximum de 60 jours à -20°C	-
Métabolites actifs	Acroléine, moutardes phorpohramide et nor azotée	α-hydroxytamoxifène, N-desmethyl-tamoxifène, 4-hydroxytamoxifène	Deséthylcirpofoxacine, oxofloxacine, sulfociprofloxacine, formylciprofloxacine

II.3.3.b. La ciprofloxacine

La ciprofloxacine est un antibiotique de la classe des fluoroquinolones qui peut être administré par voie orale, intraveineuse ou topique. Son utilisation prophylactique est, en autre, recommandée en prévention des fièvres et infections survenant après chimiothérapie pour le traitement des cancers de l'ovaire, du sein (Minckoitz *et al*., 2008), et du SCLC – *Small Cell Lung Cancer* (Tjan-Heijnen *et al*., 1999). Il est aussi couramment utilisé pour traiter la pneumonie, les infections des voies urinaires, certaines maladies sexuellement transmissibles ou encore des intoxications à l'anthrax. De plus, son

potentiel thérapeutique en tant qu'agent anticancéreux a été déterminé ces dernières années et est utilisé désormais dans le traitement du cancer de la vessie par exemple (Kamat *et al*., 1999). D'après l'AFSSAPS, la consommation de ciprofloxacine en France s'éleverait à 12 186 kg en 2004 (Besse & Garric, 2007).

Le spectre d'action de la ciprofloxacine est large, et elle agit habituellement sur un grand nombre de bactéries gram négatives et gram positives. Le mode d'action de cette molécule est fondé sur sa capacité à inhiber l'activité des gyrases bactériennes, des enzymes de la famille des topoisomérases impliquées dans la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison de l'ADN bactérien. Son action est également connue sur la topoisomèrase II chez les Mammifères, équivalente de la gyrase bactérienne, mais son affinité pour cette enzyme est 100 fois moins importante que chez la bactérie. Cette nette différence d'affinité fait de la ciprofloxacine un antibiotique de choix parmi les fluoroquinolones (Wyckoff *et al*., 1989). De plus, la ciprofloxacine est connue pour inhiber fortement l'activité des CYP P450 (Janknet, 1990). Son activité inhibitrice a notamment été mise en évidence chez le rat au niveau du CYP1A1 (Ravi *et al*., 2012) et du CYP2B (Xie *et al*., 2003), ou encore chez l'homme au niveau du CYP1A2 (Fuhr *et al*., 1992 ; McLellan *et al*., 1996) et du CYP3A (Xie *et al*., 2003). Elle inhibe aussi la β-glucuronidase (Kodawara *et al*., 2014).

Figure 7 : Structure chimique de la ciprofloxacine et de ses principaux métabolites connus.

La métabolisation de cet antibiotique se fait chez l'homme principalement au niveau du foie avec un taux qui varie entre 55 et 75 %, le reste est excrété inchangé dans les urines. Quatre métabolites ont été identifiés (desethylcirpofoxacine ; oxofloxacine ; sulfociprofloxacine ; formylciprofloxacine) dans l'urine humaine (figure 7). La sulfociprofloxacine et l'oxociprofloxacine représentent respectivement 10

et 7 % du ratio des métabolites, et la desethylciprofloxacine 1 à 8 % (Borner *et al*., 1986 ; Anadon *et al*., 2001 ; Drusano, 1987). Ces métabolites ont une activité antimicrobienne, mais ils sont moins actifs que la molécule mère (Zeiler *et al.,* 1987).

II.3.3.c. Le tamoxifène

Le tamoxifène est un modulateur des récepteurs aux œstrogènes, administré par voie orale en hormonothérapie contre le cancer du sein chez les femmes en pré- ou post-ménopause. Ce médicament est également utilisé comme un adjuvant thérapeutique pour limiter la récurrence tumorale, pour son potentiel comme agent chimio-préventif, et il aurait également un effet positif dans le traitement des maladies osseuses ou cardiovasculaires chez la femme. La consommation de tamoxifène en France pour l'année 2006 a été estimée à 335 kg, d'après les quantités de médicaments payés par le système social de santé français et distribués parmi la population française (Coetsier *et al.*, 2009). Il s’agit très certainement d’une valeur minimale puisqu’il ne s’agit que des traitements ambulatoires

Une des particularités de ce composé est qu’il peut agir comme un anti-œstrogène (agent inhibiteur) par compétitivité au niveau des récepteurs œstrogéniques dans les tissus mammaires, mais également comme un œstrogène (agent stimulateur) au sein du métabolisme du cholestérol, de la densité osseuse et de la prolifération cellulaire des cellules épithéliales de l’utérus chez les mammifères (Coezy *et al*., 1982 ; Jordan & Koerner, 1975 ; Willson *et al*., 1994). De par sa capacité à modifier l’expression des gènes œstrogène-dépendants, le tamoxifène induit une modification des mécanismes cellulaires en entrainant notamment une diminution de l’activité de l’ADN polymérase, une altération de l’utilisation des thymidines et surtout un blocage du signal œstrogénique.

Mais du fait de la généralisation de son utilisation, la communauté scientifique commence toutefois à porter une attention particulière sur ses effets délétères au niveau hépatique, puisque des cas de stéatoses hépatiques, cirrhoses et infiltrations graisseuses hépatiques ont été reportés chez des patients traités avec ce médicament (Albukhari *et al*., 2009). De plus, des études utilisant des cellules ne possédant pas de récepteurs aux œstrogènes (lignées « T-leukaemicJurkat » et cellules cancéreuses d’ovaire A2780) ont montré que le tamoxifène est capable d’induire l’apoptose des cellules par induction du stress oxydatif, suivi d’un dysfonctionnement mitochondrial et de l’activation de capsases (Zhou *et al.*, 2005). Enfin, il agit également comme un inhibiteur des P-glycoprotéines.

La métabolisation du tamoxifène se fait principalement au niveau du foie. Chez les patients traités, les principaux métabolites circulant sont le N-desmethyl-tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène, qui ont tous les deux des propriétés anti-œstrogènes (figure 8). Le N-desmethyltamoxifène, principal métabolite dans le sérum, a une demi-vie deux fois supérieure à celle du tamoxifène, et a un mode d’action similaire même s’il est un peu moins actif que la molécule-mère (O’Neill *et al*., 2004). Il est formé préférentiellement par l’activité du CYP3A4, mais des études *in vitro* avec des CYPs recombinants humains ont également indiqué une contribution des CYP2B6, 2C9, 2C19 et 3A (Crewe *et al*., 1997 ; Boocock *et al*., 2002 ; Coller *et al.*, 2003). Les autres métabolites sont formés par l’activité des CYP3A4, 2B6 et 2D6 principalement.

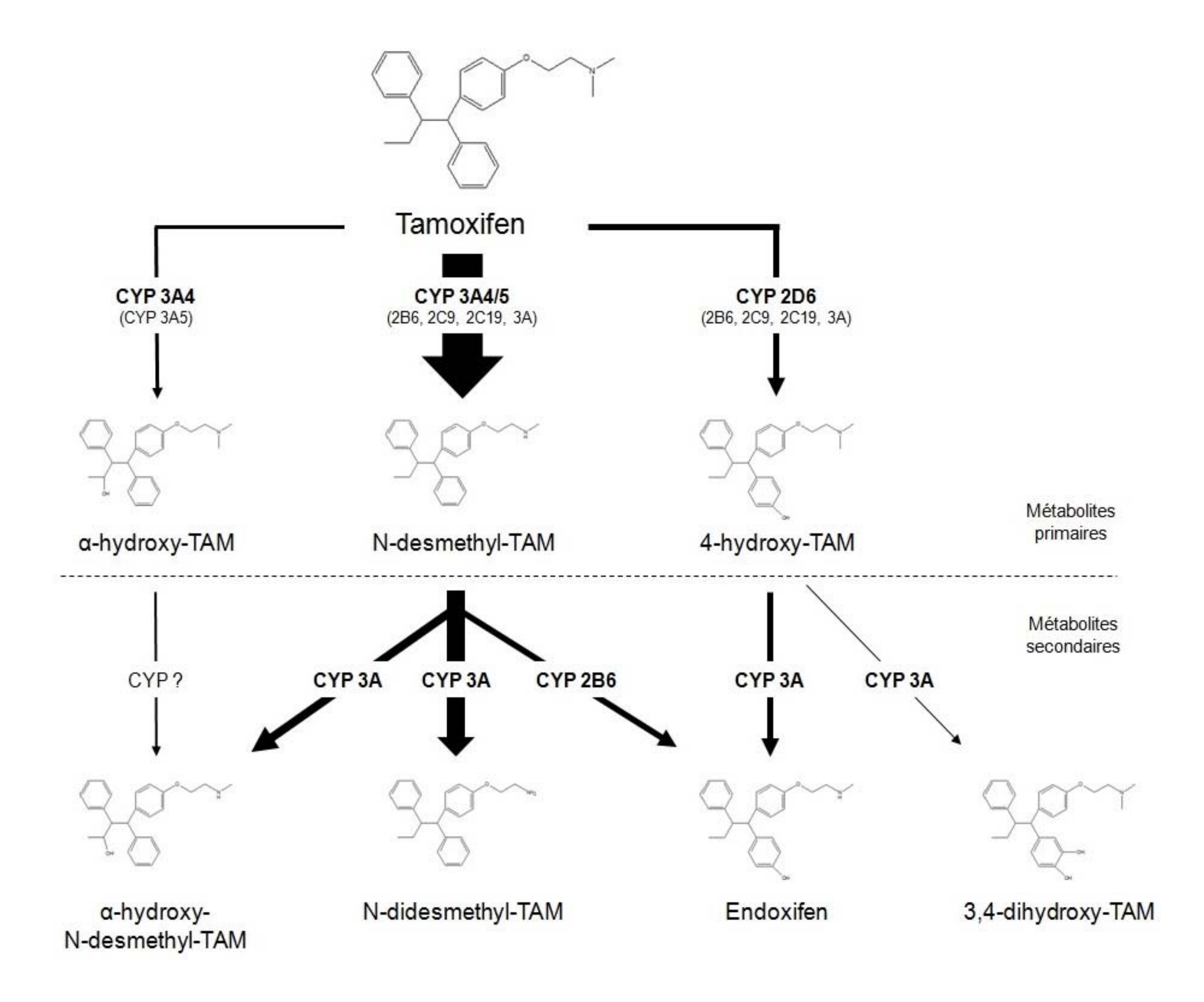


Figure 8 : Structure chimiques du tamoxifène et de ses principaux métabolites connus

Le 4-hydroxytamoxifène a une très grande affinité pour le récepteur aux œstrogènes, équivalente à celle du 17β-œstradiol (Allain, 2000 ; Fent *et al*., 2006). Cette affinité exceptionnelle est la raison principale pour laquelle le 4-hydroxytamoxifène est souvent utilisé dans les études sur le tamoxifène utilisant des cultures cellulaires. Il est formé par le CYP2D6. De manière générale, certains de ces cytochromes sont polymorphiques, ce qui explique la forte variation entre individus pour ce qui est de l'activité des enzymes le métabolisant (Coller *et al*., 2004).

II.3.3.d. Le cyclophosphamide

Le cyclophosphamide est un antinéoplasique de la classe des agents alkylants, de la famille des moutardes azotées (oxazaphosphorine) (figure 9). Introduit comme médicament anticancéreux en 1958 (Gilard *et al*., 1994), il est couramment utilisé pour traiter une grande variété de cancer, en particulier les lymphomes et les leucémies, ainsi que certains troubles auto-immunitaires. Ce composé est une prodrogue qui n'agit qu'après transformation dans l'organisme, notamment au niveau des microsomes hépatiques. Il peut être administré par voie orale ou par intraveineuse, et on le retrouve dans les urines des patients sous forme inchangée et sous forme de produits de dégradation : 15 à 36 % est retrouvée dans les urines 24 h après le traitement, et 60 à 80 % après 72 h. D'après

l'AFSSAPS, la consommation de cyclophosphamide en France s'élevait à 281,84 kg en 2004 (Besse & Garric, 2007).

De manière générale, les agents alkylants stoppent la croissance de tumeur et agissent à n'importe quel stade du cycle cellulaire, en attaquant directement l'ADN *via* trois principaux modes d'action :

- Fixation de groupes méthyle (-CH_3) sur les bases de l'ADN, provoquant la fragmentation de l'ADN lorsque les enzymes de réparation tentent de remplacer les bases alkylées (arrêt de la synthèse/transcription d'ADN) ;
- Réticulation de l'ADN (pontage), empêchant également la synthèse d'ADN et sa transcription ;
- Induction de mésappariements de nucléotides, à l'origine de mutations.

Le cyclophosphamide interagit directement avec l'ADN mitochondrial et nucléaire et forme des liaisons covalentes avec les substrats nucléophiles par l'intermédiaire de ses radicaux alcoyles. Ceci entraîne la formation de « ponts » alcoyles intrabrins ou interbrins, et ainsi une inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN lors de la division cellulaire, aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. Son action antimitotique est cycle-dépendante, il n'a aucune action sur les cellules en G_0.

Figure 9 : Structure chimiques du cyclophosphamide

Il peut également induire un stress oxydatif cellulaire (Zhang *et al*., 2008) à l'origine de perturbations au niveau de la synthèse de l'ADN et de la division cellulaire (Hengstler *et al*., 1997). Bien que cette action ne dépend pas du stade de cycle cellulaire, sa cytotoxicité est maximale dans les tissus fortement proliférateurs. Le mécanisme de liaison à l'ADN, de mort cellulaire, et la pharmacologie exact de ce composé ne sont pas encore entièrement élucidés (Boddy & Yule, 2000).

L'activation du cyclophosphamide requiert l'intervention des cytochromes (CYP) hépatiques P450 pour développer son activité cytotoxique (Moore, 1991) (figure 10). La molécule mère est relativement stable en solution aqueuse et n'a qu'une faible activité comparé à ses métabolites actifs (Moore, 1991 ; Fleming, 1997). Sa métabolisation conduit au produit actif, le 4-hydroxycyclophosphamide, en équilibre dynamique avec un autre dérivé aldophosphamide. Cet aldophosphamide est principalement dégradé en moutarde phosphorée et acroléine, dont l'élimination rénale est responsable en grande partie de la toxicité vésicale observée avec de fortes doses de cyclophosphamide. Il peut également aboutir à la formation en faible proportion d'un composé non toxique, le carboxyphosphamide (Sladek, 1999).

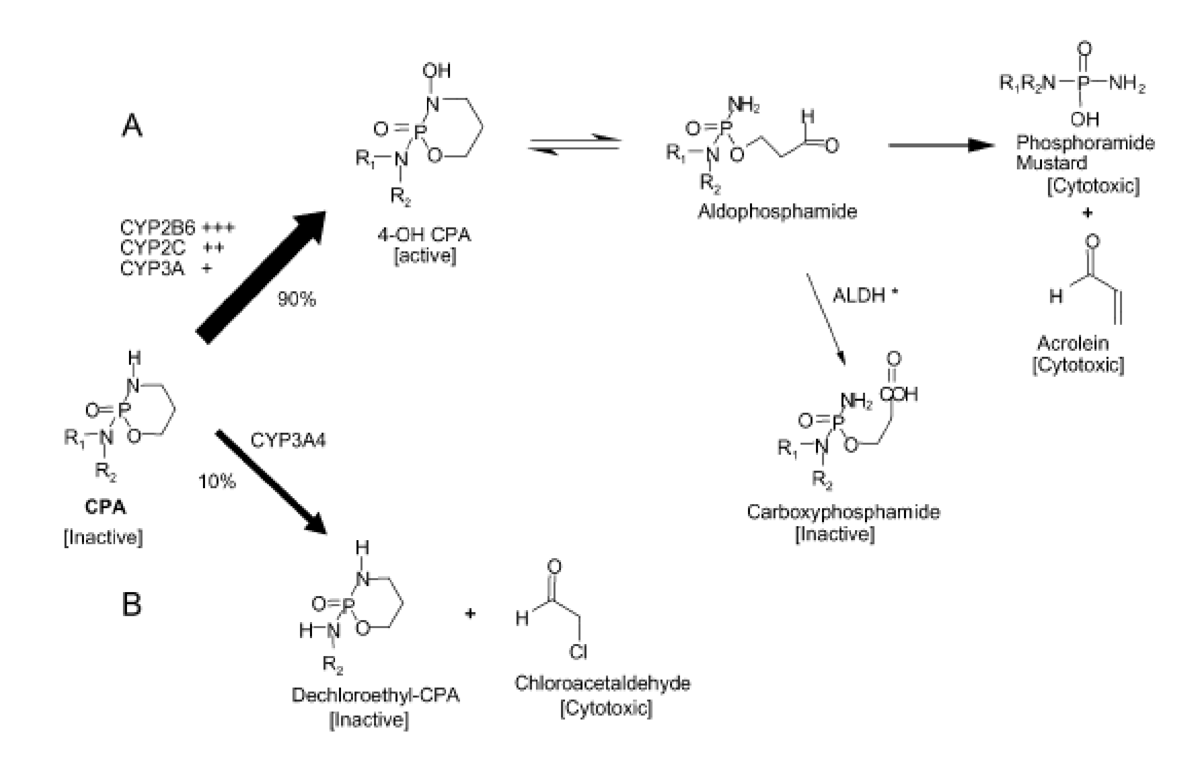


Figure 10 : Voie de métabolisation du cyclophosphamide (d'après de Jonge *et al*., 2005)

La deuxième voie de métabolisation du cyclophosphamide implique une N-déchloroéthylation qui résulte de la production équimolaire de déchloroéthyl-cyclophosphamide et de chloroacétaldéhyde (Huang *et al*., 2000). Ces deux produits n'ont aucune propriété antitumorale, mais le chloroacétaldéhyde, un cancérogène connu, est responsable de différents effets toxiques dont une neurotoxicité et une toxicité au niveau des voies urinaires (Springate *et al*., 1997)

Les cytochromes (CYP) responsables de l'activation du cyclophosphamide ont été identifiés chez le Rat et chez l'Homme. Chez l'Homme, le CYP2B6 (Roy *et al*., 1999) joue un rôle majeur dans la 4-hydroxylation du cyclophosphamide (Chang *et al*., 1993), et jusqu'à 95 % de la N-déchloroéthylation est catalysée par le CYP3A4 (Huang *et al*., 2000 ; Yu & Waxman, 1996). Toutefois, on peut noter que de fortes variations dans la cinétique et le métabolisme du cyclophosphamide ont été observées que ce soit chez l'enfant ou chez l'adulte. Ces résultats s'expliquent par les différences du niveau d'expression des enzymes CYP et le polymorphisme génétique de certaines de ces enzymes (Chang *et al*., 1997).

II.3.3.e. Présence dans l'environnement

De nombreuses études se sont intéressé à quantifier les contaminants organiques, à travers des analyses ciblées et basées sur des méthodes de détection de plus en plus sensibles. Le tableau 5 présente un inventaire non exhaustif des niveaux de contamination rencontrés ces dernières années en Europe dans les milieux aquatiques pour différentes classes de polluants. On notera que les métabolites des trois médicaments étudiés n'apparaissent pas car ils n'ont pas été recherchés.

Molécule	Type d'échantillon	Concentration (µg/L)	Pays	Référence
Ciprofloxacine	Hôpital	101	UK	Lindberg *et al.*, 2004
		25,8	Vietnam	Hong Anh Duong *et al.*, 2008
		2,5 - 15	Australie	Watkinson *et al.*, 2009
		1,4 – 26	Italie	Verlicchi *et al.*, 2012[a]
		0,03 – 125	Italie	Verlicchi *et al.*, 2012[b]
	Effluent STEP	1	USA	Brown *et al.*, 2006
		0,6 – 1,1	Australie	Watkinson *et al.*, 2009
		0,03 – 9,3	Suède	Zorita *et al.*, 2009
		0,3 – 3,7	Italie	Verlicchi *et al.*, 2012[a]
	Eaux de surface	0,02 – 0,03	USA	Kolpin *et al.*, 2002
		0,015 – 0,026	Italie	Zuccato *et al.*, 2005
	Eaux de boissons	ND	-	-
Tamoxifène	Hôpital	143	France	Zini *et al.*, 2008
		0,008	Chine	Liu *et al.*, 2010
		< LOQ – 0,04	Italie	Verlicchi *et al.*, 2012[b]
	Effluent STEP	0,143 – 0,74	UK	Roberts & Thomas, 2005
		146	France	Zini *et al.*, 2008
		0,053 – 0,101	France	Coestier *et al.*, 2009
		0,141 – 0,224	Chine	Yang *et al.*, 2011
	Eaux de surface	0,013 – 0,071	UK	Thomas & Hilton, 2004
		0,022 – 0,025	France	Coestier *et al.*, 2009
		0,120 – 0,0129	Chine	Yang *et al.*, 2011
		0,018 – 0,023	Espagne	Lopez-Serna *et al.*, 2012
	Eaux de boissons	ND	-	-
Cyclophosphamide	Hôpital	0,02 – 4,5	Suisse	Steger-Hartmann *et al.*, 1996
		4,4	France	Zini *et al.*, 2008
		0,9 – 4,4		Catastini *et al.*, 2008
		0,9 – 4,5	Italie	Verlicchi *et al.*, 2012[b]
	STEP	0,017 – 0,143	Suisse	Steger-Hartmann *et al.*, 1997
		0,3 – 0,4	France	Zini *et al.*, 2008
		0,03 – 0,4		Catastini *et al.*, 2008
	Eaux de surface	< LOQ – 0,064	Roumanie	Moldovan, 2006
		ND	Canada	Metcalfe *et al.*, 2003
	Eaux de boissons	ND	-	-

ND : non détecté ; LOQ : limite de quantification.

Tableau 5 : Concentrations en ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide mesurées dans différents types d'effluents à travers le monde.

De manière générale, la ciprofloxacine, le tamoxifène et le cyclophosphamide sont retrouvés de façon sporadique dans les effluents hospitaliers, dans les eaux usées municipales, et à de moindres concentrations dans les eaux de surface. Les niveaux de contamination rencontrés sont extrêmement variables selon la classe considérée, le compartiment étudié et selon la pression anthropique à laquelle le site d'étude est soumis. Ils varient généralement du ng/l au µg/l dans l'eau. Les fortes concentrations mesurées en aval des stations d'épuration traduisent l'efficacité partielle des stations de traitement des eaux à éliminer certains composés. Ainsi, le taux d'épuration de la ciprofloxacine est faible et estimé à 15 % environ (Watkinson *et al.*, 2007), celui du cyclophosphamide est estimé à 25 % (Catastini *et al*., 2008), alors que le tamoxifène ne serait pas du tout éliminé en station d'épuration (Zini *et al*.,2008). Il est toutefois important de souligner que ces taux d'épurations peuvent varier puisqu'ils dépendent bien évidement de plusieurs paramètres dont notamment le type de traitement utilisé en STEP.

II.3.3.f. Détermination des gammes de concentrations retenues pour l'étude

A partir de recherches bibliographiques sur les concentrations de ces trois molécules retrouvées depuis les eaux usées hospitalières jusqu'à l'environnement, les gammes de concentrations utilisées pour l'étude ont été définies entre le nanogramme et le microgramme par litre (tableau 6).

Du fait de l'emploi de plusieurs essais et d'un grand nombre de concentrations, les combinaisons des doses et des molécules sont à la fois nombreuses et complexes. Nous avons donc choisi de limiter le nombre de mélange utilisés pour simplifier la démarche expérimentale. Dans ce sens, nous avons choisi d'évaluer de la toxicité respective de la ciprofloxacine (CIP), du tamoxifène (TAM) et du cyclophosphamide (CP), puis la toxicité de mélanges ciprofloxacine + tamoxifène (CIP + TAM), et finalement la toxicité de mélange des trois molécules ensemble (CTC).

Molécules	**CONCENTRATION** (µg/L)					
CIP	0	0.01	0.1	1	10	100
TAM	0	0.01	0.1	0.5	1	10
CP	0	0.01	0.1	0.5	1	10

	CONDITIONS					
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Mélanges binaires	concentration (µg/L)					
CIP	0	0.01	0.1	1	10	100
TAM	0	0.01	0.1	0.5	1	10
Mélanges ternaires	concentration (µg/L)					
CIP	0	0.01	0.1	1	10	100
TAM	0	0.01	0.1	0.5	1	10
CP	0	0.01	0.1	0.5	1	10

Tableau 6 : Gammes de concentrations de ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide utilisées respectivement ou en mélange pour l'étude.

Les mélanges ne sont pas dans tous les cas constitués de parts égales de médicament. En effet, la CIP est retrouvée à des concentrations au moins 10 fois plus élevées dans les eaux usées hospitalières et 2 fois plus dans les stations d'épuration par rapport au TAM et au CP. Ces données s'expliquent notamment par une large utilisation de cet antibiotique en milieu hospitalier pour éviter les infections pouvant survenir lors de la chimiothérapie.

Les conditions 4 et 5 des mélanges s'apparentent aux concentrations retrouvées dans les effluents hospitaliers (facteur 10), la condition 3 aux concentrations retrouvées en station d'épuration (facteur 2), enfin les conditions 1 et 2 aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Tous ces résultats sont comparés à la condition 0 représentant la condition contrôle (témoin non exposé).

III. Outils d'évaluation en écotoxicologie

III.1. Typologie des stratégies de caractérisation des effets en écotoxicologie

Dès le début des années 70, se posait la question d'un risque croissant pour la santé et l'environnement lié au développement de l'industrie chimique, et qui au milieu du 20ème siècle apparaissait comme la clé de l'amélioration des conditions de vie (Forbes & Forbes, 1997). Il soulignait déjà les besoins de connaissances et de recherche sur le devenir et les effets des produits chimiques dans l'environnement. Bien que des améliorations soient encore à apporter, les concepts et la démarche en écotoxicologie sont maintenant largement intégrés dans les mesures visant à contrôler les apports de contaminants chimiques dans les milieux. Ils fondent en partie la réglementation de mise sur les marchés des substances chimiques, des pesticides, des substances pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire, ainsi que la gestion des milieux récepteurs (normes de rejets, normes de qualité environnementale) (pour informations supplémentaires voir Rapport 5e journée de la ZABR, 2009 ; thèse de C. Boillot, 2008).

L'écotoxicologie, la science qui étudie les impacts des agents polluants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes, développe des outils et des méthodologies qui permettent une caractérisation à la fois des dangers et des sources de pollutions (prévention sur le milieu), mais aussi de l'impact sur les milieux récepteurs (qualité des milieux, compréhension du lien pression-impact). Les outils disponibles pour l'évaluation des risques écotoxicologiques sont de trois types : les bioindicateurs, les bioessais et les biomarqueurs.

La majorité des études menées se basent principalement sur des approches prédictives qui reposent sur l'exposition à des contaminants en conditions contrôlées de modèles biologiques (bioessais), caractérisés par différentes échelles d'organisation biologique, depuis la cellule (test *in vitro*) à la communauté (mésocosme), en passant par des organismes *in toto* (tests mono et multi spécifiques).

L'évaluation du risque se fonde à la fois sur l'évaluation de l'exposition des organismes aux substances, mais également sur l'évaluation du danger biologique. Dans les deux cas, elle repose sur des données issues de modèles, qu'il s'agisse de modèles physicochimiques (transports, transformations, transferts, relation structure-activité) ou de modèles biologiques (récepteurs moléculaires, cellules, organismes) qui conduisent au calcul d'une concentration prédite dans

l'environnement (Predicted Environmental Concentration, PEC) et d'une concentration prédite sans effet toxique (Predicted Non Effect Concentration, PNEC).

Cette caractérisation des effets écotoxicologiques peut être réalisée selon deux types d'approches : l'approche substances et l'approche bioessais (figure 11). L'approche substance, qui examine différents paramètres de mesure, considère l'analyse physico-chimique de la matrice agressive (déchet, effluent) et se base sur les différents polluants (plomb, PCB, chlore, etc.) qu'elle contient, tandis alors que l'approche bioessais prend en compte la matrice comme une entité globale.

Chacune de ces deux approches (ou stratégies de caractérisation des effets) peut se subdiviser en deux sous stratégies :

- L'approche « substances », comprenant l'approche « substance seule » qui considère les effets de chacun des agresseurs de manière indépendante, et l'approche « substances avec effets combinés » qui se base sur l'ensemble des toxiques identifiés et considère leurs effets combinés.
- Les approches « bioessais », comprenant les « bioessais mono-spécifiques » qui visent un groupe défini d'individus et les « bioessais plurispécifiques » qui se définissent sur des niveaux d'organisation biologique plus élevés de type communauté. Les bioessais s'appuient sur de nombreuses espèces, tant animales que végétales, ainsi que sur de nombreux critères de mesure d'effets (mortalité, inhibition de croissance, immobilisatio etc.). Ils sont désormais normalisés.

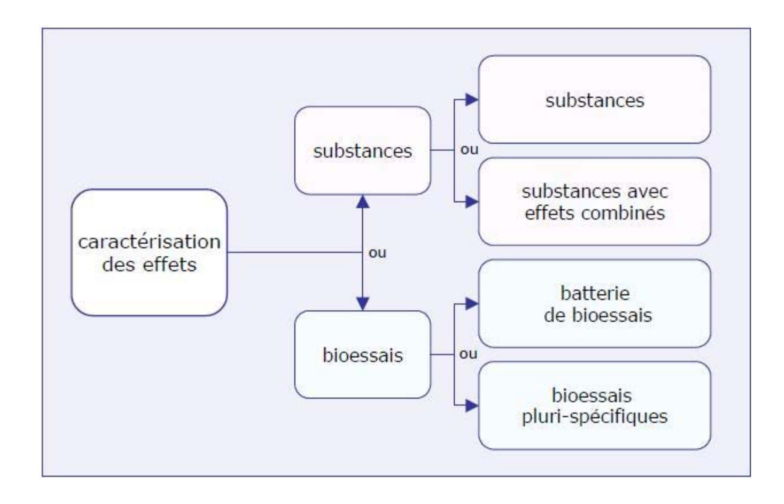


Figure 11 : Les différentes stratégies de caractérisation des effets (thèse C. Boillot, 2008).

Cette caractérisation nécessite de choisir les processus à simuler et de hiérarchiser les phénomènes que l'on souhaite modéliser. La qualité des résultats produits s'en trouve fortement affectée et l'utilisation de différents modèles d'analyses peut souvent conduire à l'obtention de résultats différents et difficiles à interpréter (Devillers *et al.*, 2000). De plus, compte tenu de la grande diversité des espèces animales et végétales dans les écosystèmes aquatiques naturels (producteurs primaires, consommateurs primaires et secondaires, décomposeurs), et du fait de la complexité des diverses

biocénoses présentes dans ces écosystèmes, le choix des espèces modèles utilisées au laboratoire est particulièrement complexe pour être représentatif de ces diverses biocénoses.

En pratique, il n'est pas envisageable de réaliser des expérimentations sur l'ensemble des espèces et dans ces conditions, le choix des espèces considérées ne peut résulter que d'un compromis entre représentativité et faisabilité. Par ailleurs, de multiples facteurs influent sur la sensibilité des organismes vivants tels que, la composition du milieu d'essai, le rapport biomasse-volume, les conditions de température et d'éclairement et les conditions d'exposition des organismes (condition de réalisation de l'essai, mode de préparation de l'échantillon). En outre, deux paramètres majeurs sont à prendre en considération : la nature des effets toxiques étudiés et la durée de l'essai.

De manière générale, l'expression des perturbations dans le milieu, quel que soit le niveau d'organisation biologique concerné (organisme, population, communauté), est la conséquence d'interactions complexes qui ne peuvent pas aujourd'hui être simulées au laboratoire. La capacité à établir des diagnostics sur l'intensité, voire la cause (source, type de contamination) des perturbations biologiques induites par des stress chimiques *in situ* a été et reste une problématique de recherche récurrente en écotoxicologie. D'autre part, se pose la question de la pertinence de ces outils biologiques pour corréler les impacts de pollutions environnementales récurrentes sur la santé humaine. Dans ce sens, il est essentiel de prendre en compte une approche d'étude pluridisciplinaire permettant de mieux appréhender les mécanismes d'action qui peuvent avoir lieu et qui parfois sont différents d'une espèce à l'autre, afin de mieux caractériser les risques d'organismes exposés aux polluants y compris l'Homme.

À cet effet, les biomarqueurs ont été largement développés à partir des années 80 sur poissons, invertébrés, végétaux puis finalement appliqués à des modèles cellulaires humains, pour répondre à ce besoin de caractérisation de la pression chimique sur les milieux et de la mise en évidence de perturbations précoces.

III.2. Détermination d'une batterie de tests pour la mesure des effets biologiques

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressé à caractériser la toxicité de différents mélanges de médicaments en utilisant plusieurs biomarqueurs de toxicité et génotoxicité sur des lignées cellulaires ou des récepteurs œstrogéniques humains intégrés de manière stable chez une levure pour tester le potentiel perturbateur endocrinien. En parallèle, l'évaluation des effets toxiques vis-à-vis de la flore et de la faune aquatiques reposant au moins en partie sur la réalisation de bioessais de toxicité de laboratoire, nous avons décidé d'utiliser également en parallèle des bioessais standardisés.

L'utilisation de ces outils a pour but d'évaluer la sensibilité des différents modèles d'étude procaryotes ou eucaryotes avec des doses environnementales de médicaments ou des échantillons bruts d'eaux usées, de comparer les réponses obtenus respectivement et de vérifier leurs complémentarités ou au contraire leurs redondances. Ces différents outils sont présentés et développés dans les parties ci-après.

III.2.1. Les biotests mono-spécifiques

Historiquement, les premiers essais de laboratoire visaient à évaluer les effets létaux (effets aigus) ou sublétaux (effets chroniques) d'une substance sur des organismes issus d'une culture ou d'un élevage en laboratoire. Ces essais ont déjà trouvé une application dans l'évaluation de l'écotoxicité de matrices complexes liquides ou solides tels que des effluents, des déchets ou des sols pollués (Volatier, 2004). Les finalités de ces évaluations sont diverses : la gestion des déchets, des sols et des sites pollués ; la valorisation des boues en agriculture ; la classification des déchets ; ou encore la caractérisation des sources de pollutions environnementales.

Les essais mono-spécifiques concernent en règle générale des groupes d'individus définis, placés dans des conditions de milieu et d'environnement conventionnelles. De ce fait, ils ne prétendent pas simuler toutes les conditions de l'environnement et ne prennent pas en compte des éventuelles interactions entre l'échantillon testé et d'autres composés présents dans l'environnement qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique (tableau 7).

Organisme	Niveau trophique	Type d'exposition	Durée d'exposition	Critère d'effet	Norme
Daphnia magna (invertébré)	CP	aiguë	24 et 48h	inhibition de la mobilité	NF EN ISO 6341 (T90-301)
Vibrio fischeri * (bactérie)	D	aiguë	15 et 30 min	inhibition de la luminescence	ISO 11348-3
Pseudokirchneriella subcapitata * (algue)	PP	chronique	72h	inhibition de la croissance de la population	NF EN ISO 8662 (T90-304)
Ceriodaphnia dubia (invertébré)	CP	aiguë	24 et 48h	inhibition de la mobilité	NF EN ISO 6341 et ISO 20665
Brachionus calyciflorus (rotifère)	CP	chronique	48h	inhibition de la reproduction	PR NF ISO 20666
Lemna minor * (végétal supérieur)	PP	chronique	7j	inhibition de la croissance de la population	ISO 20079

*CP : consommateur primaire ; D : décomposeur ; PP : producteur primaire ; * : biotest retenu pour l'étude*

Tableau 7 : Caractéristiques des essais couramment utilisé dans le cadre d'évaluation des risques environnementaux associés à la présence de polluants.

Ces bioessais sont réalisés dans des conditions expérimentales biotiques (espèce, âge) et abiotiques (température, photopériode, nature de l'éclairement, durée d'exposition, composition physico-chimique du milieu) contrôlées et souvent standardisées (tant au niveau national qu'international : AFNOR, ISO, UE, OCDE). Cela permet d'une part de fixer et maîtriser au mieux les facteurs connus pour influer sur

la réponse des organismes, et d'autre part, de comparer des résultats obtenus, notamment surdifférents polluants et entre différents laboratoires (Taub, 1989 ; Volatier, 2004 ; Clément, 2006). Ils répondent au mieux aux critères de répétabilité, reproductibilité, fiabilité et robustesse, en plus de leur facilité de réalisation, du faible investissement nécessaire pour leur mise en place, de leur coût modéré, ainsi que de leur capacité à prédire les effets d'une grande variété de substances sur des organismes différents. Toutefois, ils ne permettent pas de révéler une toxicité ou un mécanisme cellulaire spécifique.

L'utilité des essais mono-spécifiques pour caractériser les substances ou les matrices complexes vis-à-vis de leurs caractéristiques écotoxiques intrinsèques n'est plus à prouver. Ils s'avèrent essentiels à l'obtention d'informations sur les concentrations (d'une substance ou d'une matrice) et les durées d'exposition qui induisent des effets sur la mortalité, la reproduction, la physiologie ou encore le comportement d'un organisme (Cairns Jr., 1983). Chaque espèce a ses propres sensibilités.

Toutefois, le « mythe » du bioessai universellement sensible à tous les polluants est aujourd'hui abandonné (Cairns Jr., 1986) et les bioessais sont le plus souvent associés pour former des batteries de bioessais. Elles permettent alors de réaliser le screening le plus complet du potentiel toxique de la matrice ou des polluants considérés. D'autre part, on peut souligner d'autres limites concernant ces essais, comme notamment l'utilisation d'un nombre restreint d'espèces et leur réalisme "écologique" limité, étant donné qu'ils sont réalisés dans des conditions d'environnement conventionnelles souvent fort éloignées des conditions environnementales naturelles.

De plus, on peut noter que dans le cas de leur utilisation pour l'évaluation de l'écotoxicité des effluents, deux limites supplémentaires apparaissent. Il s'agit d'une part de la difficulté de réaliser des essais de toxicité à long terme compte tenu de l'évolution possible de l'effluent au cours du temps, et d'autre part de l'impossibilité de préciser la ou les substance(s) à l'origine de l'éventuelle toxicité mise enévidence.

III.2.1.a. Le test Microtox®

Le test Microtox® est un test de toxicité standardisé (AFNOR T 90-320) qui utilise une suspension de bactéries marines luminescentes (*Vibrio fischeri*) pour mesurer la toxicité aiguë de solutions aqueuses. Le phénomène de luminescence est produit au cours d'un enchaînement de processus métaboliques de la glycolyse et de la respiration cellulaire, mettant en jeu l'enzyme luciférase et des coenzymes d'oxydoréduction (Mayfield, 1993). L'inhibition d'une seule de ces nombreuses enzymes par l'interaction avec des polluants est révélée par une perturbation de la luminescence.

Le Microtox® a été développé commercialement par la compagnie Microbics, et mis sur le marché en 1978 (Bulich, 1979, 1986). Il est à présent vendu et utilisé partout dans le monde, ce qui a donné une littérature scientifique importante et une banque de données appréciable sur les contaminants (Kaiser & Ribo, 1988). L'essai a connu un succès rapide pour le suivi de la toxicité d'effluents de stations d'épuration domestiques et industrielles du fait de sa commercialisation sous forme lyophilisée ne nécessitant pas d'installation d'élevage (Jean, 1991 ; Santiago *et al*., 2002).

Les qualités du Microtox® sont la simplicité, la rapidité, la reproductibilité, la sensibilité, et le désignent comme choix logique pour une pré-évaluation (screening) de la toxicité ou au sein d'une batterie. Ce test de surcroît ne requiert que de petits volumes d'échantillons, ce qui augmente son intérêt. On peut également noter qu'il ressort d'une façon générale que le Microtox® est d'une sensibilité comparable aux autres tests basés sur les daphnies, les poissons et les algues (Qureshi *et al.*,1982 ; Ribo & Kaiser,1983 ; Beaubien *et al*., 1986), et fournit une bonne corrélation linéaire avec ces espèces (Ribo & Kaiser, 1983 ; Blum & Speece, 1991).

III.2.1.b. Le test Algaltox F™

Le test Algaltox F™ est un test de toxicité simple et standardisé (AFNOR T 90-304) qui utilise une suspension d'algue verte unicellulaire d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement *Selenastrum capricornutum* ou *Raphidocelis subcapitata*), et qui mesure la toxicité chronique de solutions aqueuses en mesurant l'inhibition de la croissance.
Cet organisme dulçaquicole de la famille des *Chlorophyceae*, présent dans une grande diversité de milieux aquatiques et pouvant se développer dans la colonne d'eau, des sédiments ou sur des supports divers (Cauzzi, 2007), est représentatif des producteurs primaires.

Le kit a été développé par une équipe belge du laboratoire de recherches biologiques en Pollution aquatique (LABRAP) de l'université de Ghent (Persoone *et al*., 1997), et il est commercialisé depuis une dizaine d'années. Il permet de réaliser à moindre coûts des tests de toxicité. Simple, sensible et reproductible, il présente l'avantage de fournir tout le matériel nécessaire pour l'essai, y compris les organismes tests pouvant être « activés » selon les besoins. A l'heure actuelle, cet outil biologique est fréquemment utilisé pour déterminer la toxicité d'échantillons liquides tels que les eaux usées (industrielles, municipales, agricoles), les eaux de lixiviation, les lixiviats de résidus solides, les eaux réceptrices, les substances chimiques solubles dans l'eau, toute solution susceptible de contenir des substances toxiques ou encore pour identifier les échantillons qui entraînent une stimulation de la croissance algale liée à la présence d'azote et de phosphore.

III.2.1.c. Le test d'inhibition de la croissance sur *Lemna minor*

Le test d'inhibition de la croissance de population de *Lemna minor* est un test de toxicité simple et standardisé qui mesure, comme le test Algaltox F™, la toxicité chronique de solutions aqueuses en mesurant l'inhibition de la croissance. Cette espèce cosmopolite, qui est un macrophyte, sert dans les essais de détection de la phytotoxicité depuis les années 30. Elle a notamment servi à déterminer les effets des premiers herbicides dérivés de l'acide phénoxyacétique (Blackman & Robertson-Cuninghame, 1955). Cette plante est à la fois représentative de l'impact de pollutions environnementales de par son appartenance aux écosystèmes aquatiques, mais aussi utile à l'évaluation au moyen d'essais phytotoxicologiques de l'innocuité de nombreux polluants, des effluents colorés, turbides ou encore chargés en MES (Wang, 1990 ; Clément, 1994).

A l'heure actuelle, ce bioessai qui présente de nombreuses qualités propices aux essais toxicologiques (petite taille, structure relativement simple, croissance rapide, etc.) est devenu un outil

standardisé incontournable en écotoxicologie. Les méthodes d'essais normalisées utilisant *Lemna* comprennent notamment celles de l'*United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 1996), de l'Association française de normalisation (AFNOR, 1996), de l'institut des normes de Suède (SIS, 1995) ou encore de l'*Institute of Applied Environmental Research* (ITM, 1990).

III.2.2. Les biomarqueurs

Bien que les études écotoxicologiques sur les polluants « émergeants » dans l'environnement aient été effectués sur plusieurs types d'organismes modèles non cibles, les effets ont été évalués à l'aide de tests standardisés ou de tests *in vitro* non-spécifiques qui ne sont pas appropriés pour les médicaments anticancéreux (Zounkova *et al*., 2010). Ces outils ne permettent pas toujours de déterminer la toxicité des métabolites et les interactions en mélange et ne sont sensibles généralement qu'avec de fortes concentrations. Il faut également souligner que la majorité des études porte sur l'évaluation de doses thérapeutiques et que le risque d'une exposition de la faune et la flore aquatique, ou encore l'homme, à de doses environnementales de composés pharmaceutiques reste encore largement inconnu (Crane *et al*., 2006).

Avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire, le concept de biosurveillance (ou « biomonitoring »), qui repose sur la réponse biologique des organismes aux polluants, est aujourd'hui en plein essor. Les effets biologiques peuvent être assimilés à des indicateurs biologiques (ou biomarqueurs) de pollution dans le règne animal et végétal. Ces biomarqueurs sont des changements structuraux ou fonctionnels, observables et/ou mesurables à divers niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale), qui révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997). L'idée n'est pas nouvelle : c'est le principal diagnostique en médecine humaine, fondée sur la détection de symptômes susceptibles de révéler une maladie (Lafaurie *et al*., 1992). Le fondement historique de l'approche biomarqueur est d'ailleurs étroitement lié aux avancées en médecine et biologie des invertébrés (National Reasearch Council : NRC, 1987).

De manière générale, il est d'usage de distinguer différents types de biomarqueurs pouvant révéler à la fois une toxicité aigüe et chronique sur les organismes (Ramade, 2007) (tableau 8) :

- **les biomarqueurs d'exposition :** détectent la présence de certains contaminants dans le milieu et indiquent que l'organisme a bien été en contact avec ces substances. Cependant la réponse n'implique pas obligatoirement d'effets délétères sur l'organisme ;
- **les biomarqueurs d'effets :** indiquent un dépassement des capacités de régulation de l'organisme, qui va se traduire par des effets biologiques.

Toutefois, on notera que la mise en œuvre des biomarqueurs mesurés au niveau sub-individu, à des fins de surveillance de la qualité du milieu ou d'un diagnostic de stress toxique, présente deux limites. L'une des limites concerne la qualification et la quantification des mécanismes explicatifs de la variabilité spatio-temporelle de la mesure, la seconde une certaine difficulté à interpréter les résultats

à une organisation biologique suffisante pour extrapoler un danger vis-à-vis des organismes et leur population (Forbes *et al*., 2006) et motiver des mesures de gestion conséquentes.

Mais les études menées depuis une trentaine d'année tendent à monter que la surveillance des effets des polluants par la mesure de la réponse « biomarqueur » chez des organismes reste pertinente et valable, surtout dans le cas où une batterie de biomarqueurs est analysée sur le même échantillon. Ils peuvent notamment permettre la détection spécifiques de dommages à l'ADN, ce qui représente une nécessité dans l'évaluation de la génotoxicité (Burgeot *et al.,* 1996 ; Bartsch *et al*., 1998). Dans une revue relativement récente réalisée par des chercheurs britanniques et français, les biomarqueurs font d'ailleurs partie de la « boite à outils » proposée pour mener à bien la surveillance chimique et biologique dans le cadre de la DCE (Allan *et al*., 2006). Pourtant, à l'heure actuelle, l'évaluation du risque par les biomarqueurs n'est pas encore envisagée dans la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000 ; Marine Pollution Bulletin, 2007).

Dose / Effet de la substance	Paramètre de mesure	Application temporelle	Affecté par le polymorphisme
Dose externe	Concentration de la substance dans l'environnement (air, eau, aliment, ...)	Directe	non
Dose interne (biomarqueur d'exposition)	Concentration de la substance dans les fluides biologiques (sang, urine, ...)	Minute - Heure	peu
Dose biologique efficace	Adduits à l'ADN Adduits aux protéines	Jour - Mois	oui
Biomarqueurs de susceptibilité	Induction enzymatique (GST, CYP, ...)	Minute - Heure	oui
Effets biologiques précoces (biomarqueurs d'effets)	Aberration chromosomique (CA) Micronoyaux (MN), Aneuploïdie	Semaine – Mois	oui
Réponse biologique	Expression d'oncogènes	Semaine – Mois	oui
Effet tardif	Marqueurs tumoraux	Mois - Années	? (non étudié)
Maladie	Tumeur	Années	oui

Tableau 8 : Marqueurs biologiques, apparition temporelle et influence du polymorphisme enzymatique (d'après Pfohl-Leszkowicz, 2008 ; 2014).

III.2.2.a. Biomarqueurs de viabilité : Test MTS

Très répandu dans le monde scientifique pour sa simplicité et sa rapidité d'analyse de toxicité de composés chimiques sur des cellules humaines, le test de viabilité cellulaire MTS est une alternative plus sensible (Cory *et al*, 1991) du test MTT mis au point dans les années 80 (Mosmann, 1983).

La survie de lignées cellulaires est évaluée par une méthode colorimétrique basée sur la détection de la conversion d'un dérivé du tétrazolium (MTS) par les cellules métaboliquement actives. Les cellules vivantes possèdent des déshydrogénases mitochondriales qui réduisent le composé MTS de couleur

jaune (aussi nommé 3-(4,5–dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) en formazan de couleur pourpre, soluble dans le milieu de culture. Ce test est donc essentiellement une mesure de l'activité mitochondriale.

III.2.2.b. Biomarqueurs de génotoxicité

L'étude des dommages à l'ADN a été proposée comme étant un outil adapté à l'évaluation des propriétés génotoxiques des polluants environnementaux, et à leur détection dans le milieu naturel (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993 ; Hebert & Luiker 1996 ; Nunn *et al.*, 1996 ; Shugart, 2000). Les biomarqueurs de génotoxicité sont aujourd'hui considérés comme une part intégrale de l'approche écotoxicologique (Frenzili *et al.*, 2009). Ils présentent un fort intérêt pour les études d'impact sur des espèces sentinelles aquatiques (Parry *et al.*, 1976 ; Prein *et al.*, 1978). Parmi les nombreux travaux réalisés en milieu naturel on peut citer les analyses des cassures simples et double-brin de l'ADN pour le biomonitoring environnemental. On peut également citer les analyses de la formation d'adduits à l'ADN en tant que biomarqueur d'exposition à des composés génotoxiques mutagènes et cancérogènes présents dans les écosystèmes aquatiques (Shugart & Theodorakis 1994 ; Stein *et al.*, 1994 ; Burgeot *et al.,* 1996 ; Livingstone *et al.*, 2000 ; Shugart, 2000 ; Bocquéné *et al.*, 2004 ; Amat *et al.*, 2006).

Toutefois, même si l'utilisation de batterie de test n'a fait qu'augmenter pour mesurer l'impact de xénobiotiques sur des espèces et milieux aquatiques (Orias & Perrodin, 2013), il est important aujourd'hui d'élargir les champs d'investigation de l'écogénotoxicité à l'Homme.

III.2.2.b.1. Mesure des effets perturbateur endocrinien (test YES/YAS)

L'action d'un xénobiotique dans la cellule peut se faire directement sur un « récepteur » cellulaire. La substance qui entre alors en compétition avec diverses autres molécules endogènes peut entrainer une dérégulation du système endocrinien. Cette substance est alors qualifiée de « perturbateur endocrinien ». De manière générale, les perturbateurs endocriniens (PE) sont des composés qui ont été décrits comme des « substances exogènes qui altèrent le fonctionnement du système endocrinien et par conséquent causent des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, de sa descendance ou d'une sous population » (WHO, 2002). De ce fait, les PE correspondent à une classe de composés définis non pas chimiquement mais par leur action biologique.

Il existe un grand nombre de mécanismes par lesquels les PE peuvent moduler le système endocrinien et engendrer des effets néfastes sur plusieurs fonctions de l'organisme. L'un des mécanismes majeurs qui relaient ces altérations, implique la fixation des PE aux récepteurs nucléaires et la modulation des réponses géniques régulées par ces récepteurs. Cette modulation peut être de type agoniste (activation) ou antagoniste (inhibition).

Parmi les récepteurs connus, on peut citer notamment les récepteurs aux œstrogènes (ER) qui jouent un rôle clef dans les processus de reproduction, de développement, de comportement et de physiologie des organismes. On peut également citer les récepteurs aux androgènes (AR) impliqués dans la différenciation sexuelle et le développement des caractères sexuels secondaires chez les

vertébrés, ou encore dans le métabolisme et la régulation du système immunitaire (Li & Al-Azzawi, 2009). L'activation anormalement du ER conduit généralement à une augmentation de la transcription de ses gènes cibles. L'augmentation de la synthèse de vitellogénine (Jobling *et al*., 1998), une féminisation ou encore une intersexualité (Nash *et al*., 2004 ; Flammarion *et al*., 2000) sont les effets les plus fréquemment rapportés. En comparaison, il existe moins d'informations disponibles sur les ligands environnementaux du AR. Les ligands identifiés chez l'homme sont principalement des antagonistes et correspondent très fréquemment à des agonistes du ER.

Depuis près de 30 ans, des perturbations endocriniennes ont été observés dans l'environnement et les molécules incriminées ont pu être identifiées (Revue par Jobling *et al*., 1998 ; Sumpter *et al*., 2005 ; WHO 2002 ; Hotchkiss *et al*., 2008). Certaines études ont notamment mis en évidence des impacts plus ou moins importants chez l'Homme, dont des perturbations au niveau neurologiques, immunitaire, comportementale, ou encore de la reproduction, suite à des expositions à diverses molécules chimiques telle que les PCB, PCDDF ou DES (Colborn *et al*., 1993 ; Guo *et al.*, 1995).

Au cours de notre étude, nous avons choisi d'utiliser la levure de boulanger ou de brasseur commune (*Saccharomyces cerevisiae*) génétiquement modifiée et qui possède un gène exprimant le récepteur humain aux œstrogènes hERα, dit test YES pour « *Yeast Estrogen Screen* », ainsi que le récepteur humain aux androgènes hAR, dit test YAS pour « *Yeast Androgen Screen* », couplé à un gène rapporteur. Les levures ont la capacité, par une suite de réactions enzymatiques, de produire la β-galactosidase qui transforme la couleur jaune de départ du mélange en couleur rose qui absorbe à 540 nm en spectroscopie ultraviolet-visible.La mise en contact des cultures de levure avec un xénobiotique ou un effluent, permet de rendre compte directement des évènements perturbateurs endocriniens induit pas les solutions.

III.2.2.b.2. Test des comètes

La première observation de dommages à l'ADN a été faite par Rydberg et Johanson (1978) sur des cellules de mammifères lysées et incluses dans l'agarose. Les dommages double brin à l'ADN avaient alors été marqués à l'acridine orange et mesurés à l'aide d'un photomètre, en rapportant la quantité d'ADN double brin (fluorescent en vert) à la quantité d'ADN simple brin (fluorescent en orange). Ce n'est que six ans plus tard que la méthode impliquant une électrophorèse sur microgel a été mise au point pour la détection de cassures double-brin à pH ≤ 9 (Östling & Johänson, 1984). La technique a ensuite été élargie à la détection de cassures simple-brin en condition alcaline (Singh *et al*., 1988), puis optimisée (Belpaeme *et al*., 1998) et finalement standardisée (Tice *et al*., 2000).

Les principaux atouts de cet outil sont l'absence de spécificité des cassures pour un composé génotoxique donné, l'application à de nombreux types cellulaires (indépendamment de la phase du cycle cellulaire) et de ne pas nécessiter d'extraction d'ADN ; l'analyse des dommages de l'ADN se fait directement sur les noyaux (Shugart 1990 ; Nacci *et al*., 1996 ; Devaux *et al*., 1998 ; Livingstone *et al*., 2000). Après incubation des cellules aux échantillons de xénobiotiques testés, elles sont incluses dans de l'agarose déposé sur des lames de microscope, lysées dans une solution alcaline de forte force ionique, puis soumis à une électrophorèse en conditions alcalines. Les étapes critiques à

maitriser concernent la lyse des membranes cellulaires et nucléaires afin d'éviter tout artefact expérimental pouvant introduire des cassures de la chromatine (Lemière, 2004).

Durant l'électrophorèse, l'ADN nucléaire présentant des cassures induites par le ou les xénobiotiques migre de manière hétérogène. Cette migration est d'autant plus importante que la fragmentation augmente. Elle se traduit après marquage fluorescent par une image de type comète (figure 12), qui se compose d'une « tête » représentant le pool d'ADN intact et d'une « queue » représentant les fragments d'ADN.

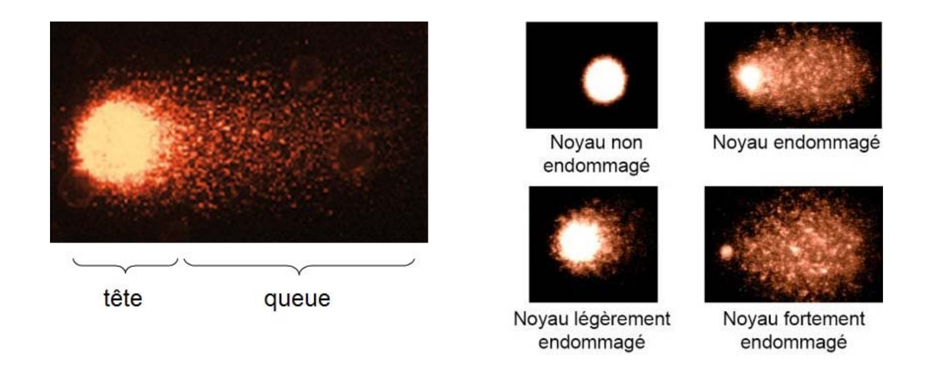


Figure 12 : Description d'une image de type « comète » et caractérisation de noyaux endommagés et non endommagé.

Le test des comètes peut détecter chez toutes les populations de cellules eucaryotes pouvant être cultivées en suspension unicellulaire, les cassures simples et doubles brins, les sites labiles alcalins, et potentiellement les pontages (ou réticulation) ADN-protéines et/ou ADN-ADN (Burlinson *et al*., 2007 ; Dhawan *et al*., 2009). Il rend également compte des processus de réparation par excision et resynthèse qui génèrent transitoirement des cassures. Cependant, cela ne peut pas être considéré comme des dommages en soi, mais comme un marqueur d'exposition à des facteurs génotoxiques (Shaw *et al*., 2000 ; Smart *et al*., 2006). D'autre part, on notera que les cellules dites « circulantes » dans l'organisme sont généralement moins sensibles que les hépatocytes et les cellules de branchies dans le cas d'espèces aquatiques (Pandey *et al*., 2006 ; Kim *et al*., 2006 ; Huang *et al*., 2007).

A l'heure actuelle, des directives de l'OCDE recommandent son utilisation dans l'évaluation de la génotoxicité chez les mammifères, le protocole de cet essai n'est pas pour autant standardisé. Par conséquent, de faibles variations dans le protocole peuvent aboutir à des différences majeures de résultats. Il existe d'ailleurs un consensus pour inclure des mesures de cytotoxicité lors de l'expérimentation afin de mieux interpréter les résultats (Hartmann *et al*., 2003 ; Burlinson *et al*., 2007).

III.2.2.b.3. Technique de post-marquage des adduits à l'ADN au ^{32}P

L'objectif de beaucoup d'études menées ces dernières années a été d'établir les relations entre la biotransformation, la réparation et le développement de cancers chez l'Homme lors d'exposition à des contaminants environnementaux. De par la capacité de ces polluants à nuire à l'intégrité génétique d'une cellule, la détection spécifique de dommages à l'ADN représente une nécessité dans l'évaluation de la génotoxicité (Bartsch *et al*., 1998).

La formation d'adduits à l'ADN est une étape essentielle dans le processus de carcinogénicité. Le mode d'action implique en premier lieu l'interaction d'une molécule électrophile avec un site nucléophile de l'ADN qui produit un adduit. Les bases azotées de l'ADN représentent, à ce titre, des cibles privilégiées. En absence de réparation, ou lors d'une réparation erronée, ces adduits peuvent provoquer une mutation et une altération de la fonction du gène, ce qui peut entrainer une cascade de réponses délétères à tous les niveaux de l'organisation cellulaire (Pfohl-Leszkowicz, 1994, 2008). L'analyse de la formation d'adduits par des molécules électrophiles ou leurs métabolites est donc importante, mais les altérations sont généralement faibles et impliquent que les méthodes de détection soient sensibles.

Depuis plus de vingt ans, de nombreuses méthodes ont été développées pour l'analyse des adduits. Les méthodes les plus utilisées incluent des techniques de détection électrochimique, de spectrométrie de masse, de spectroscopie par fluorescence ou phosphorescence, d'immunologie et d'immuno-histochimie ainsi que de post-marquage au ^{32}P. La sensibilité de chacune de ces techniques dépend du taux d'ADN qui peut être analysé et varie généralement de 1 adduit /10^7 nucléotides à 1 adduit /10^9 nucléotides. Suivant les méthodes d'enrichissement de ces adduits, cette sensibilité peut même atteindre un niveau de détection de 1 adduit /10^{10} nucléotides pour la technique de post-marquage au ^{32}P, et de 1 adduit /10^{11} nucléotides par la technique dite AC-MS (Accelerator Mass Spectrometry) utilisant un accélérateur de particules.

La technique de post-marquage au ^{32}P est aujourd'hui largement répandue pour la détection et la caractérisation d'adduits à l'ADN formés par de nombreux cancérogènes, allant des composés aromatiques aux composés aliphatiques (Phillips, 1997). Elle est exploitée en tant que biomarqueur dosimétrique de l'exposition à des polluants environnementaux (Pfohl-Leszkowicz, 1994). On peut citer par exemple le suivi de la génotoxicité chez plusieurs espèces aquatiques exposées à une marée noire suite au naufrage de l'Erika en 1999 au large des côtes bretonnes (Amat *et al*., 2005, 2006).

Cette technique est réalisé à partir d'ADN isolé (extraction, purification) où toute traces d'ARN et de protéines pouvant entrainer des artéfacts ont été éliminés (Gupta, 1993). L'ADN est tout d'abord hydrolysé en nucléosides 3'-monophosphate, puis s'en suit une étape dite d'« enrichissement » à la nucléase P1 afin de ne garder que les nucléosides 3'P modifiés. Cette étape d'enrichissement permet d'éliminer les nucléotides normaux en les convertissant en nucléosides. Les nucléotides adduités, possédant un phosphate du côté 3', vont ainsi être les seuls substrats de la T4 polynucléotide kinase du phage T4, qui a pour propriété de transférer un phosphate radioactif provenant du [γ-32]ATP sur la position 5' du nucléotide. Les adduits marqués sont ensuite déposés sur des plaques de polyethylèneimine-cellulose, et séparés par chromatographie multidirectionnelle échangeuse d'anions encouche mince (TLC) dans unsystème de solvants basés sur les propriétés chimiques des molécules adduitées. La détection des adduits se fait par autoradiographie sur des écrans amplificateurs pendant 18 h à 24 h qui seront analysés sur un bioimager (typhoon).

Bien que la technique soit extrêmement sensible pour la détection des adduits à l'ADN, elle n'est qu'une méthode semi-quantitative et ne permet pas de fournir des informations structurales sur les adduits.

En effet, la structure chimique peut être supposée à partir de la mobilité chromatographique des spots d'adduit observés, mais leur attribution doit être accomplie indirectement par des analyses cochromatographiques avec des adduits standards synthétiques, ou par spectrométrie de masse s'il est possible d'isoler une quantité suffisante d'adduit analysable. La quantification s'effectue par mesure de la radioactivité incorporée. En connaissant l'activité spécifique, le nombre d'adduits modifiés par µg d'ADN peut être calculé. Les résultats sont finalement exprimés en nombre d'adduits/10^9 nucléotides.

III.2.2.c. Utilisation de lignées cellulaires humaines comme modèle d'étude

Selon la définition du Comité de terminologie de l'Association américaine de culture de tissu (Schaeffer, 1979), les cultures cellulaires correspondent au maintien en dehors de l'organisme de cellules non organisées en tissu, mais capables de se diviser et d'exprimer *in vitro* des métabolismes et des fonctions spécifiques.

Les cultures cellulaires se sont développées pour deux raisons majeures : d'une part car les cultures cellulaires ont atteint un très haut niveau de technicité ; d'autre part pour des raisons éthiques. En effet, les pays industrialisés ont pris conscience que la souffrance des animaux n'était pas indispensable aux progrès de la santé humaine. L'utilisation des cultures primaires chez l'homme est limitée par les difficultés d'obtention de prélèvements adéquats en particulier chez les sujets sains. De plus, ce type de culture a une durée de vie limitée même dans des conditions de culture optimales (Gruenert *et al.*, 1990). C'est la raison pour laquelle ont été développées des techniques d'immortalisation cellulaire donnant lieu à des lignées cellulaires.

Sous le nom de lignées cellulaires, on regroupe :

- Les lignées dérivant de tissus sains, de caractère diploïde et à durée de vie limitée. Ces cellules « meurent » inéluctablement au bout d'un certain nombre de subcultures; cette mort étant précédée par une période de vieillissement.
- Les lignées cellulaires issues de tumeurs, qui sont des lignées transformées immortelles ayant acquis toutes les caractéristiques des cellules tumorales ;
- Les lignées cellulaires immortalisées grâce à des virus ;
- Les lignées résultant de transfections de matériel génétique étranger.

Ces deux dernières lignées immortalisées sont des lignées cellulaires à durée de vie illimitée obtenues par transfection de gènes viraux ou cellulaires immortalisants (Type T de SV40 ou cmyc).

III.2.2.c.1. Avantages et inconvénients liés à leur utilisation

Les avantages évidents des lignées établies sont la disponibilité d'un matériel expérimental, en principe identique au départ et cela sans procédure d'isolement, la facilité de culture dans des milieux connus, et en ce qui concerne les lignées d'origine humaine, l'absence de restriction éthique pour l'obtention des échantillons. Elles conservent certaines propriétés spécifiques ; des enzymes y sont inductibles. Certaines fonctions « éteintes » peuvent être restaurées par un choix judicieux du milieu

de culture. Elles peuvent aussi être apportées dans le milieu, ou encore transfectées. Ces lignées sont très utilisées en toxicologie et en particulier dans des études de génotoxicité et de métabolisme.

Cependant, elles ne sont pas toujours représentatives du tissu d'origine. Elles sont partiellement dédifférenciées. En général, elles sont plus résistantes aux toxiques que les cellules fraîchement isolées. Enfin, les lignées cellulaires sont soumises à des phénomènes de vieillissement et on peut voir leur phénotype évoluer avec le nombre de passage. Ceci entraîne des limites et des précautions d'emploi. Certains aspects importants sont difficiles à étudier sur les lignées cellulaires. Par exemple, l'étude de la régulation de la réplication cellulaire est délicate sur ces lignées dont la transformation assure une prolifération indéfinie. Par ailleurs, certaines caractéristiques des contacts intercellulaires tels la présence de « tight-junctions » peuvent manquer, limitant les possibilités d'étude de la perméabilité cellulaire. Les lignées cellulaires constituent néanmoins un outil précieux en biologie cellulaire et toxicologie, sous réserve d'une utilisation réfléchie pour l'étude d'un mécanisme précis.

III.2.2.c.2. Description des lignées utilisées

Au cours de ce travail de thèse, nous avons utilisé deux lignées cellulaires pour évaluer la génotoxicité des médicaments seuls ou en mélange, et des échantillons bruts d'eaux usées.

III.2.2.c.2.1. Les cellules hépatiques humaines (HepG2)

La lignée de cellules HepG2 (*ATCC HB-8065*) a été établie par Aden *et al*. (1972) à partir d'un carcinome hépatocellulaire provenant d'un homme adulte. Ces cellules sont de type épithélial non tumorigènes, et conservent les propriétés de cellules hépatiques primaires telles que leur activité de métabolisation (Lu & Huang, 1994). Ces cellules expriment notamment une grande variété d'enzymes de phase I (cytochromes P450 1A1, 1A2, 2B, 2C, 3A et 2E1, arylhydrocarbone hydrolase, nitroréductase, N-déméthylase, catalase, peroxydase, NAD(P)H cytochrome c reductase, cytochrome P450 reductase et NAD(P)H, quinone oxidoréductase) et de phase II (époxyde hydrolase, sulfotransférase, glutathione S-transférase, glucuronosyl transférase et N-acétyl transférase) (Knasmüller *et al.*, 1998).

En raison de leur expression endogène d'une grande variété d'enzymes métabolisant les xénobiotiques et à propriétés antioxydantes, les cellules HepG2 sont des indicateurs valables des composés ayant des propriétés génotoxiques, ainsi que pour détecter les effets combinés de mélanges de molécules (Mersch-Sundermann *et al.*, 2004 ; Zegura *et al*., 2009). Les observations les plus intéressantes montrent notamment que les cellules sont particulièrement sensibles aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et permettent de détecter la génotoxicité d'un nombre important de carcinogènes, tels que les mycotoxines, alors que les résultats obtenus avec d'autres bioessais étaient négatifs. Des études soulignent aussi leur utilité dans les recherches d'antimutagénicité, où les cellules HepG2 peuvent permettre d'identifier des mécanismes non détectés par des tests *in vitro* conventionnels, tels que l'induction d'enzyme de détoxification, l'inactivation des métabolites réactifs ou encore l'inactivation intracellulaire d'enzymes du métabolisme (Knasmüller *et al.*, 1998, 1999 ; Uhl *et al*., 2000).

III.2.2.c.2.2. Les cellules mammaires humaines (MCF-7)

MCF-7 est l'acronyme de Michigan Cancer Foundation - 7, en référence à l'institut de Detroit où la lignée fut établie en 1973, par Herbert Soule et son équipe (Soule *et al.*, 1973). Etablie en culture *in vitro* à partir d'un épanchement pleural prélevé chez une patiente de 69 ans atteinte d'un cancer du sein métastatique, la lignée MCF-7 (*ATCC HTB-22*) a été à l'origine d'une bonne partie des connaissances actuelles sur le cancer du sein (Levenson, 1997). Elles sont cancéreuses non métastatiques et conservent plusieurs caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié, y compris la capacité de traiter l'œstradiol par l'intermédiaire des récepteurs cytoplasmiques œstrogéniques ou encore la capacité de former des dômes qui contiennent l'oncogène Tx4.

La plupart des carcinogènes mammaires humains potentiels nécessitent une multitude d'étape de catalyse enzymatique avant d'être convertis en métabolites réactifs de l'ADN. Ces étapes peuvent passer soit par une voie métabolique primaire hépatique suivie d'une conjugaison secondaire avec un groupement chimique approprié, soit par une activation métabolique *in situ* au niveau du sein, soit par une combinaison des deux (Williams & Phillips, 2000). Bien que l'activité des gènes CYP se passe majoritaire au niveau des cellules hépatiques, l'activité de certains cytochromes (CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4) est aussi détecté dans les cellules mammaires (Tsuchiya *et al*., 2004).

La lignée cellulaire mammaire MCF-7 a été choisie pour son utilisation dans l'évaluation de la toxicité et l'apparition de phénomène perturbateur endocrinien induit par des composés chimiques. Ces cellules sont citées dans un tiers des publications scientifiques, et présentent la particularité de conserver une grande variété de récepteurs aux œstrogènes, androgènes, progestérone et glucocorticoïdes (Horwitz *et al.*, 1975 ; Lippman *et al*., 1976). De ce fait, cette lignée cellulaire représente un outil pertinent pour la recherche d'effets perturbateur endocrinien de mélanges de molécules (Levenson & Craig Jordan, 1997 ; Charles *et al*., 2002). On peut citer par exemple certaines études portant sur le bisphénol A comme celle menée par Iso *et al.* (2006) où la présence de cassures à l'ADN avait été recherchée sur ce modèle cellulaire.

IV. Objectif de la thèse et démarche scientifique

Au travers de cette synthèse bibliographique, nous avons pu constater que la problématique des polluants émergeants dans l'environnement et les milieux aquatiques est une préoccupation importante. De par la consommation grandissante des produits pharmaceutiques, comme notamment en milieu hospitalier, et du fait de leur caractère souvent persistant dans l'environnement, les molécules pharmaceutiques représentent un risque à la fois pour les organismes aquatiques, mais également pour l'Homme. Le risque est d'autant plus important que ces molécules sont le plus souvent présentes en mélange et que leur propriété thérapeutique intrinsèque les définit comme biologiquement actives. C'est le cas par exemple des médicaments anticancéreux, ou de perturbateurs endocriniens. Bien que l'évaluation de l'impact de ces pollutions soit maintenant une problématique mondiale et que de nombreuses études soient menées à l'aide d'outils normalisés sur divers niveaux trophiques des écosystèmes aquatiques, le risque potentiel concernant l'exposition de l'Homme reste encore mal documenté.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de thèse a été d'utiliser une batterie de tests de toxicité afin d'évaluer le caractère toxique de faibles doses de médicaments rejetés seuls ou en mélange dans les effluents hospitaliers et détectés dans l'environnement. Cette batterie de tests a ensuite été appliquée sur des échantillons bruts d'eaux usées, afin d'évaluer sa pertinence dans l'évaluation du risque environnementale et déterminer la capacité d'épuration des traitements biologiques classiquement utilisé en STEP.

Le premier objectif de la thèse a été d'évaluer l'impact de faibles doses de médicaments couramment utilisées dans les protocoles de traitements anticancéreux. La toxicité des molécules modèles sur la viabilité de plusieurs organismes d'étude a été évaluée dans un premier temps à l'aide des bioessais et d'un biomarqueur, puis l'analyse du potentiel perturbateur endocrinien et de la génotoxicité a été faite à l'aide de biomarqueurs. Cette partie a pour but de valider la sensibilité des outils pour détecter l'induction d'un effet toxique, et comparer les réponses obtenus afin de vérifier leur complémentarité ou leur redondance et confirmer *in fine* la pertinence de leur utilisation dans l'analyse du risque.

La deuxième partie de la thèse a eu pour but d'appliquer cet ensemble d'outils pour caractériser la toxicité globale ou spécifique d'effluents hospitaliers et leur évolution spatio-temporelle dans les réseaux urbains d'égoûts avant leur rejet dans l'environnement.

La globalité de ce travail a pour vocation, non pas de déterminer les CE_{50} ou de suivre point par point les démarches écotoxicologiques recommandées, mais au contraire d'appliquer un ensemble d'outils simples et rapides sur des échantillons bruts pour déceler un phénomène de pollution et évaluer l'efficacité des traitements actuellement utilisés en STEP (biologique, chimique, etc.) pour dépolluer les eaux usées.

Matériels & Méthodes

I. Description des essais biologiques retenus pour l'étude

I.1. Le test Microtox®

I.1.1. Principe

Le fonctionnement du test est basé sur la capacité de la bactérie marine *Vibrio fischeri* à émettre de la lumière comme sous-produit de la respiration. La bioluminescence bactérienne est attribuable au système luciférine-luciférase codé par un groupe de gènes appelé opéron Lux. Chez cette bactérie, 5 gènes (LuxCDABE) sont directement impliqués dans l'émission de lumière visible à une longueur d'onde de 490 nm et deux autres(LuxRI) sont impliqués dans la régulation de l'opéron Lux.

La mesure de la luminescence accède au flot d'électrons de la chaîne respiratoire et à l'état métabolique de la cellule (Hastings & Nealson, 1977). L'agression toxique entraîne une diminution de la respiration et donc de la bioluminescence. La lumière est mesurée avec un protocole et un dispositif luminométrique spécifiques (figure 13). La réduction de lumière à 5, 15 ou 30 minutes permet le calcul d'un facteur d'inhibition de la luminescence et donc d'apprécier le potentiel toxique aigüe d'un composé ou d'une solution (ISO 11348-3). Il est toutefois à noter que chez *V. fischeri*, la luminescence ne peut être observée qu'à partir d'une certaine taille de population car la transcription des gènes impliqués est induite par « corum sensing » (Dunlap, 1999). De plus, des facteurs externes peuvent également modifier l'intensité de la luminescence. Par exemple, l'accroissement de l'osmolarité ou de la teneur en aldéhyde (substrat de la luciférase) augmente la luminescence de la bactérie (Stabb *et al*., 2004). Il est donc important de contrôler et maitriser les conditions de l'expérimentation.



Figure 13 : Dispositif expérimental de l'essai Microtox®.

I.1.2. Protocole

Les cellules de *V.fischeri* NRRL B 11177 utilisées pour le test Microtox® sont fournies sous forme lyophilisée par R-Biopharm et conservées à -20°C. Leur réhydratation est réalisée dans une solution nommée « solution de reconstitution » commercialisée par Strategic Diagnostics Inc. Les cellules ainsi réhydratées peuvent alors être stockées à 4°C durant un maximum de 4 heures ou être diluées et exploitées immédiatement. La dilution des bactéries s'effectue à l'aide d'une solution appelée SDBR contenant : 20 g/L de NaCl ; 2,035 g/L de$MgCl_2$, 6 H_2O ; et 0,3 g/L de KCl. Afin d'ajuster la pression

osmotique du milieu, une solution OAS à 22 % de NaCl est préparée au laboratoire pour être ajoutée aux échantillons avant leur mise en contact avec les bactéries. Enfin, les témoins positifs de CrVI à 50 mg/L et de Zn^{2+} à 4 mg/L sont obtenus à l'aide de poudre de K_2CrO_4 et de $ZnSO_4$, 7 H_2O distribuées par VWR.

Calcul du facteur d'inhibition de la luminescence

Juste avant l'addition de la solution à tester, l'émission de lumière a été mesurée quantitativement par un dispositif photométrique (Microbics Model 500 Analyser) (figure 14) pour chaque échantillon (I_0) et pour les témoins (I_{t0}). La diminution de lumière a été déterminée après 30 minutes d'exposition avec la solution à tester (I_{30} et I_{t30}) et exprimée enpourcentage moyen d'inhibition d'émission de lumière par rapport au témoin par la formule suivante:

$$I = \left[1 - \frac{I_{30} \times I_{t0}}{I_0 \times I_{t30}} \right] \times 100$$

Lors de chaque test Microtox, un triplicata est réalisé pour tous les échantillons. De plus, des solutions de contrôle (Zn^{2+} à 4 mg/L et CrVI à 50mg/L) dont le facteur d'inhibition est connu (60 % pour l'ion Zn^{2+} et 80 % pour le CrVI après 30 minutes de contact avec *V. fischeri*) sont également analysées, afin de garantir la fiabilité des manipulations (ISO 11348-3).

I.2. Le test Algaltox F™

I.2.1. Principe

Le test se base sur l'évaluation de l'inhibition de la croissance d'une population d'algues vertes unicellulaires *Pseudokirchneriella subcapitata* après un contact de 72 h avec un échantillon liquide. Cet essai chronique est réalisé d'après la norme NF EN ISO 8662 (T90-304) (2005), et il est recommandé par l'agence environnementale américaine (US EPA) (Greene *et al*., 1989) et par le ministère canadien de l'environnement (Environment Canada, 1992).

I.2.2. Protocole

Les solutions d'essai ont été préparées et distribuées suivant un profil déterminé pour obtenir un duplicata de chaque concentration ou mélange testé, et du témoin. Chaque erlen a reçu 49 mL de solution d'essai avec de l'eau déionisée (1 mL), additionné de solution nutritive et d'inoculum algal (figure 14). L'inoculum a été préparé à partir d'une culture d'algue en phase exponentielle de croissance de 4 à 7 jours, et les concentrations finales en nutriments sont données en annexes. La sensibilité des algues est vérifiée par un essai avec du chlorure de dichromate de potassium comme témoin positif pour valider l'inhibition des algues (> 95 %).

Chacun des erlen est homogénéisé puis répartis dans deux « cellules » (cuves) d'une contenance de 25 mL, puis une mesure de la D.O est effectuée à t_0 sur l'ensemble des cellules préparées. La densité cellulaire initiale était de 1.10^6 cellules/mL. Les cuves sont ensuite incubées à une température

constante de 24 ± 2°C et sous un éclairage continu de 10.000 lux durant 72 h, puis la concentration d'algues (cellules/mL) est à nouveau mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'essai est statique, et les mesures de D.O sont faites tous les jours pendant 72 h afin de suivre le bon déroulement de l'expérience.

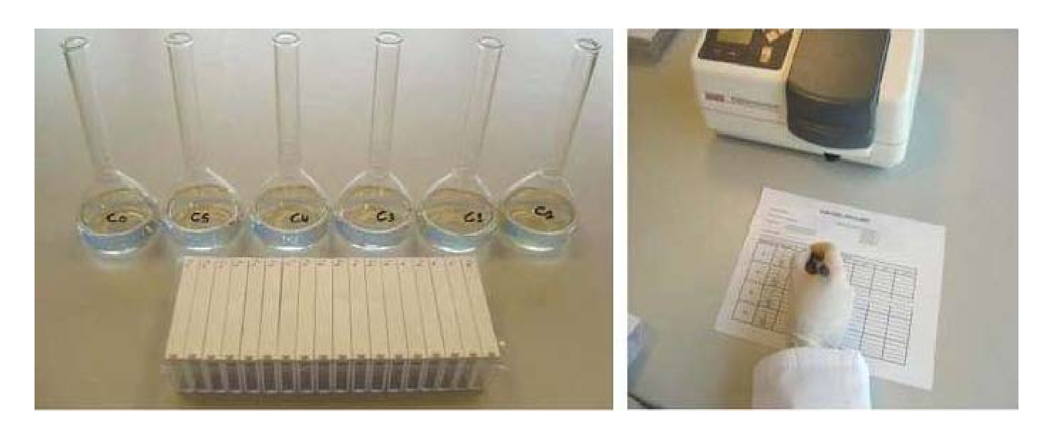


Figure 14 : Dispositif expérimental de l'essai Algaltox F™.

Calcul de l'effet inhibiteur de chaque dilution

Pour chaque échantillon testé, on calcule le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (*I*) en pourcentage, par rapport au taux de croissance moyen des lots témoins:

$$I = \left[\frac{d_{72h} - d_0}{d_{t72h} - d_0} \right] \times 100$$

où d_{72h} est la densité cellulaire moyenne des deuxréplicas de l'échantillon après 72 h d'incubation, d_{t72h} est la densité cellulaire moyenne des témoins et d_0 est ladensité initiale (inoculum).

Critères de validité de l'essai :

- La concentration cellulaire moyenne des lots témoins est multipliée par un facteur supérieurà 67 en 72 heures ;
- Le coefficient de variation des solutions témoins ne dépasse pas 5 % ;
- Le pH des solutions témoins n'a pas augmenté de plus de 1,5 unités pendant l'essai par rapport au pH du milieu de croissance ;
- La sensibilité de la souche du laboratoire est contrôlée par des essais réguliers avec le dichromate de potassium.

I.3. Le test d'inhibition de la croissance sur *Lemna minor*

I.3.1. Principe

Cet essai chronique est réalisé d'après la norme ISO 20079 (2005). Il consiste à évaluer l'effet inhibiteur d'une solution ou d'un effluent sur la croissance de populations de lentilles d'eau en 7 jours en fonction de deux critères : le taux de croissance du nombre de fronde et de la surface verte.

I.3.2. Protocole

L'essai est réalisé avec des colonies de deux ou trois frondes de *Lemna minor* issues d'une culture du laboratoire acclimatée pendant au moins 10 jours aux conditions d'expérience. Le milieu de dilution est le milieu normalisé Steinberg modifié, pH > 4.6, détaillé en annexes.

Lors de l'expérience, une série de trois erlens contenant chacun 100 mL de milieu de culture est préparée pour chaque échantillon à tester, ainsi que pour le témoin. Les solutions à tester sont additionnées au milieu, puis 3 colonies de 2 ou 3 frondes sont introduites dans chaque erlen.

Cet essai statique est réalisé pendant 7 jours, dans un phytotron à 24 ± 2°C, sous éclairage continu de 8.000 lux et pour une photopériode de 14 h de jour et 10 h de nuit (figure 15). A la fin de l'essai les frondes sont dénombrées, pesées, et le pH mesuré pour valider l'essai.



Figure 15 : Dispositif expérimental de l'essai sur *Lemna minor.*

<u>Calcul de l'effet inhibiteur de chaque dilution</u>

Le calcul de l'inhibition de la croissance de *L. minor* est identique à celui effectué dans le cadre de l'essai d'inhibition de croissance de la population de *P. subcapitata* (*cf.* Mat & Meth, § I.2.2).

<u>Critères de validité de l'essai :</u>

- Le taux de croissance obtenu pour le lot témoin est d'au moins 0,275 par jour.
- La sensibilité de la souche est contrôlée par un essai avec le chlorure de potassium dont la CE_{50} (nombre de frondes) est comprise entre 5,5 et 10,0 g/L.

I.4. Évaluation du potentiel perturbateur endocrinien : test YES/YAS

I.4.1. Principe

Le test *in vitro* YES/YAS utilisé est basé sur la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* qui a été génétiquement modifiée pour identifier les composés interagissant avec les récepteurs humains aux œstrogènes (test YES) et aux androgènes (test YAS). Pour cela, soit les séquences génomiques

des récepteurs œstrogéniques hERα, soit celle des récepteurs androgéniques hAR, ont été insérées dans le chromosome principal des levures. De plus, les cellules contiennent également un plasmide d'expression portant le gène rapporteur LacZ codant l'enzyme β-galactosidase (Routledge & Sumpter, 1996 ; Sohoni & Sumpter, 1998).

Dès la liaison au ligand, les hERα et hAR interagissent avec le domaine de liaison correspondant (LBD) sur le plasmide d'expression et déclenchent la transcription du gène rapporteur lacZ. La β-galactosidase secrétée dans le milieu convertit le substrat jaune *chlorophenolred-β-D-galactopyranoside* (CPRG) en produit de dégradation rouge quantifiable par colorimétrie. La D.O mesurée à 570 nm est directement proportionnelle à la quantité de β-galactosidase secrétée et révèle ainsi l'activité de la substance testée qui a interagit avec le récepteur correspondant. L'essai mesure également les effets cytotoxiques qui induisent l'arrêt de la croissance cellulaire ou la lyse des cellules par spectrophotométrie à 690 nm.

I.4.2. Protocole

Des microplaques 96 puits sont ensemencées avec des cultures de levure *S. cerevisiae*, puis traitées avec différentes dilutions semi-logarythmiques de solutions à tester. Au total, 4 microplaques sont utilisées, chacune permettant de révéler un type d'activité induit par la solution (agoniste/antagoniste des récepteurs aux œstrogènes ; agoniste/antagoniste des récepteurs aux androgènes). Les échantillons sont incubés en présence d'une gamme de concentration d'un perturbateur connu pour définir le contrôle de référence : le 17β-œstradiol (agoniste) ou le 4-hydroxytamoxifène pour le récepteur aux œstrogènes hERα, et le 5α-dihydrotestostérone (agoniste) ou le flutamide (antagoniste) pour le récepteur aux androgènes hAR.

Les levures sont ensuite incubées pendant 48 h à 32°C en présence d'un substrat de la β-galactosidase. L'expression de la β-galactosidase est directement proportionnelle à la présence de composés agonistes (activateurs) ou antagonistes (inhibiteurs) qui conduisent à la conversion du substrat jaune en un produit de dégradation rouge, le chlorophénol rouge. Le développement colorimétrique et la croissance fongique sont quantifiés par spectrophotométrie respectivement à 570 et 690 nm. Les résultats sont interprétés comme activités agonistes ou antagonistes aux œstrogènes et androgènes aussi bien ainsi que comme fongicides ou fongistatiques. Les explications simplifiées de la procédure de l'essai, ainsi que les formules utilisées pour les calculs induction d'activité des récepteurs, sont détaillées en annexes.

I.5. Biomarqueurs de toxicité sur lignées cellulaires humaines

I.5.1. Culture des cellules

I.5.1.a. Produits utilisés en culture cellulaire

Les lignées cellulaires proviennent de chez ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA). Les milieux de croissance utilisés pour les cultures cellulaires sont les suivants :

- HepG2 : minimum Eagle's medium (MEM) ;

- MCF-7 : Eagle's minimum essential medium (D-MEM avec 1 g/L de D-glucose et supplémenté par 2 µM de glutamine).

Ces milieux ainsi que le tampon phosphate salin (PBS), et la trypsine ont été obtenus chez Invitrogen Life-Technologies (Cergy Pontoise, France). Le tampon PBS est constitué de KCl 0,2 g/L, KH_2PO_4 0,2 g/L, NaCl 8 g/L, Na_2HPO_4 1,15 g/L, pH 7,4. La solution de trypsine est constituée de Trypsine (0,05%)-EDTA (0,53 mM). Le milieu nutritif est supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) apportant des facteurs mitogènes nécessaires à la division cellulaire, 1 % d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline), et 1 % de L-glutamine, de fournis par Life-Technologies (Cergy Pontoise, France). Pour les cellules MCF-7, 15 µL (1 ‰) d'insuline bovine (facteur de croissance) sont ajoutés dans une flasque contenant 15 mL de milieu. Les consommables proviennent du laboratoire Becton Dickinson. Le diméthyle sulfoxide (DMSO) provient de chez Sigma (France).

I.5.1.b. Conditions de culture des cellules

I.5.1.b.1. Maintien des constantes physico-chimiques

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm^2, contenant 15 mL de milieu de culture supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) et antibiotiques, à 37°C dans une atmosphère humide et saturée à 5 % CO_2 dans une étuve stérile. Le système tampon utilisé est le bicarbonate (HCO_3^-) en équilibre avec le CO_2 de l'étuve, permettant de maintenir un pH de 7,4.

I.5.1.b.2. Mise en culture d'une lignée cellulaire

Les souches cellulaires sont conservées dans de l'azote liquide dans 1 mL d'une solution de congélation contenant 10 % de DMSO et 40 % de sérum de veau fœtal. Sorti de l'azote liquide, le tube reste 1 min à température ambiante avant d'être porté à 37°C, 1 min dans un bain-marie. Dix mL de milieu de culture complet (10 % de sérum de veau fœtal, 1 % de pénicilline/streptomycine), préalablement chauffé à 37°C, sont versés dans une flasque de 75 cm^2 avec 1 mL de la culture de cellule décongelée. Une nuit à 37°C permet l'adhésion des cellules au support. Au bout de trois jours, les cellules ne pouvant plus se développer correctement due à l'épuisement du milieu de culture, il est nécessaire d'effectuer un passage ou repiquage pour maintenir la viabilité des cellules et l'état de culture. Cette opération permet l'amplification de la culture cellulaire.

I.5.1.b.3. Amplification d'une lignée cellulaire

Cette étape consiste à réduire le nombre de cellules des flasques, afin de leur permettre de poursuivre leur développement correctement. Le repiquage des cellules est effectué à 80 % de confluence. Le milieu de culture est aspiré et la flasque est rincée à deux reprises avec du PBS. Ceci a pour but d'éliminer les traces de SVF, inhibiteur de la trypsine. Trois mL de trypsine (1 X) pour les cellules HepG2 et 3 mL de trypsine (0,5 X) pour les cellules MCF-7, préalablement chauffée à 37°C, sont ajoutés dans chaque flasque afin de décoller le tapis cellulaire. La flasque est ensuite placée à 37°C pour favoriser l'activité enzymatique de la trypsine. Quand la dissociation du tapis cellulaire est visible à l'œil nu, la trypsination est stoppée par addition de 5 mL de milieu de culture complet dans la

flasque. Le surnageant contenant les cellules est récupéré et centrifugé 10 min, à 2000 rpm (Sigma 3k10) à 4°C. Les cellules sont remises en suspension dans 3 mL de milieu et réparties dans différents flacons à raison de 1 mL par boite, auxquels sont ajoutés 14 mL de milieu de culture (figure 16).

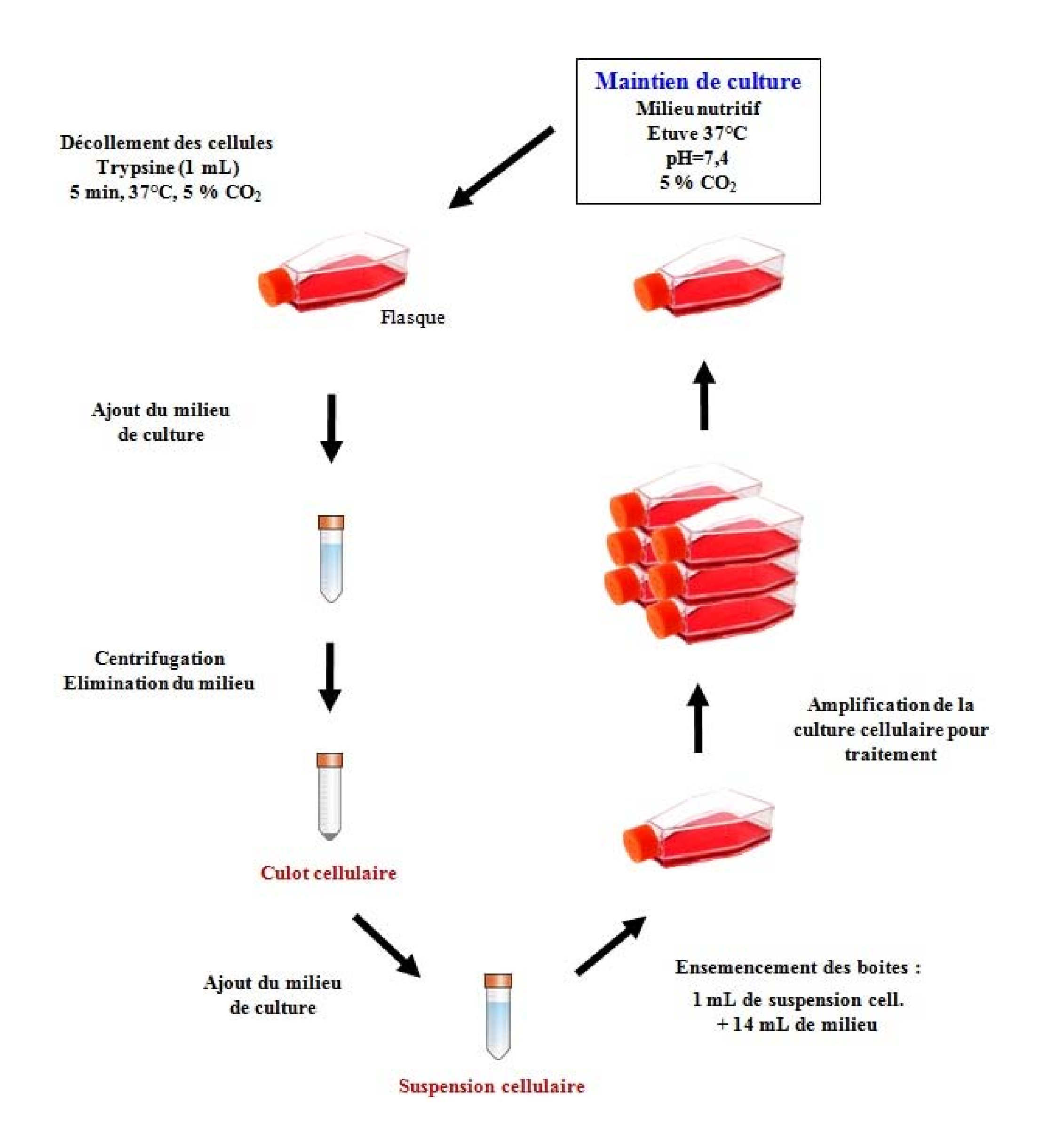


Figure 16 : Schéma général de culture de cellules.

I.5.1.b.4. Conservation d'une lignée cellulaire

Les cellules à confluence d'une flasque sont décollées par trypsination (addition de 3 mL de trypsine (1 X) pour les cellules HepG2 et de 3 mL de trypsine (0,5 X) pour les cellules MCF-7) ; elles sont culottées par centrifugation 10 min, à 4°C, 2400 rpm (Sigma 3k10), puis le culot est remis en suspension dans 1 mL de milieu de congélation. Le milieu de congélation est composé comme suit : il s'agit de milieu de culture, sans antibiotiques, supplémenté avec 10 % DMSO et 40 % SVF. Le mL de milieu de congélation, contenant les cellules, est disposé dans des tubes cryogéniques NALGENE, placé une nuit à –80°C dans une boite de cryocongélation, puis conservé dans l'azote liquide.

I.5.1.b.5. Conditions de traitement des cellules

Quel que soit le type cellulaire, les traitements ont été effectués avec un milieu supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal et 1 % de pénicilline/streptomycine, 1 % L-glutamine.

L'intégrité des cellules est évaluée avant chaque traitement par méthode d'exclusion au bleu de Trypan. Une partie des cellules cultivées sont aliquotées après trypsination et centrifugation, puis resuspendues dans 3 mL de milieu complet. Une suspension à pH 7,2 contenant 500 µL de cellules, 300 µL de tampon PBS et 200 µL de bleu de Trypan (Sigma, France) est incubée à l'étuve, 37°C, 5 % CO_2, pendant 5 à 10 min, puis les cellules viables sont dénombrées sur « cellules de Malassez ». La viabilité des cellules en phase exponentielle de croissance doit être au final au dessus de 95 %. Les cellules sont ensuite traitées par des solutions de médicaments, seuls ou en mélanges, diluées dans du milieu de culture stérile non supplémenté en SVF, puis incubées à l'étuve à 37°C selon un temps prédéfini (24 h, 48 h, 72 h).

La ciprofloxacine, le tamoxifène citrate et le cyclophosphamide (Sigma, France) sont respectivement dissout dans de l'HCl 0,1 N, du méthanol pur et de l'eau milliQ pour préparer des solutions mères à 1 g/L, conservées à -20°C pendant 3 semaines maximum. Bien que la concentration des solvants dans le milieu de culture des cellules au début du test soit considérée comme négligeable (< 1 ‰), une analyse du milieu additionné aux différents solvants a été faite pour vérifier l'absence d'effets toxiques (données non présentées).

I.5.2. Test de viabilité cellulaire (MTS)

I.5.2.a. Produits utilisés

Le test de prolifération a été réalisé sur des plaques de 96 puits de chez Falcon fournies par Becton Dickinson (Le pont de Claix, Allemagne). Les réactifs viennent du kit : « Celltiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay » (R G3580) non radioactif acheté chez Promega (Allemagne) contenant la solution « MTS».

I.5.2.b. Principe

Très répandu dans le monde scientifique pour sa simplicité et sa rapidité d'analyse de la toxicité de composés chimiques sur des cellules humaines, le test MTS est une alternative plus sensible (Cory *etal*, 1991) du test MTT mis au point dans les années 80 pour évaluer le nombre de cellules viables (Mosmann, 1983).

De manière générale, l'essai MTS est un test colorimétrique de prolifération cellulaire fondé sur l'activité métabolique des cellules viables. Il mesure l'activité des enzymes mitochondriales, les succinates déshydrogénases, qui réduisent le MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4 sulfophenyl) 2H-tetrazolium), un tétrazole de couleur jaune, en formazan (figure 17). Les cristaux de formazan formés sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm.

Cet essai possède deux avantages par rapport au test MTT : le mélange MTS+PMS est plus réactif que le MTT, et le produit formé est soluble dans l'eau. Ce nouvel essai est donc théoriquement plus sensible que le test MTT.

Figure 17 : Structure du MTS tétrazolium et son produit le formazan.

La mitochondrie étant impliquée dans la respiration cellulaire et la production d'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule (*via* le cycle de Krebs et la production d'ATP), son activité est donc révélatrice de la viabilité cellulaire. En mesurant l'activité mitochondriale de cellules exposées à un xénobiotique, le test MTS permet de révéler un ralentissement de l'activité métabolique des cellules qui rend compte des événements apoptotiques et nécrotiques intervenants dans la cellule.

I.5.2.c. Protocole

Après détachement du tapis cellulaire collé au fond de la boite par trypsination (2 min à 37°C), la suspension cellulaire est centrifugée à 2000 rpm (Sigma 3k10), pendant 10 min à 4°C. Après avoir éliminé le surnageant, le culot cellulaire est repris dans 4 mL de milieu à 5 % SVF pour effectuer le comptage des cellules sur « cellule de Mallassez ». Chaque puits de la plaque de 96 puits est ensemencé avec 5.10^3 cellules. Après une nuit d'adhésion des cellules sur le support à 37°C, 10 µL des concentrations de médicament à tester, sont ajoutés, en triplicata, dans les puits pendant 24 h à 37°C. De même, un témoin sans traitement est réalisé par l'ajout de 10 µL de milieu.

Pour les cellules MCF-7, le milieu est changé au bout de 24 h avant l'ajout des traitements. Les puits sont vidés en tapotant sur du papier ou de la gaze stérile, et le milieu est remplacé par un nouveau milieu. Il s'agit d'ajouter dans chaque puits 90 µL de milieu DMEM incomplet (sans SVF) au quel on ajoute 5 % de milieu CS (traité sur charbon actif). Le SVF non traité peut contenir des hormones bovines qui pourraient influencer la croissance des cellules et biaiseraient le test. Les cellules traitées sont alors incubées pendant 24 h à 72 h à 37°C. A la fin de l'incubation, 20 µL de solution de MTS sont ajoutés. Après 3 h d'incubation à 37°C, l'absorbance de chaque puits est mesurée grâce à un lecteur de plaques 96 puits à 490 nm (figure 18).

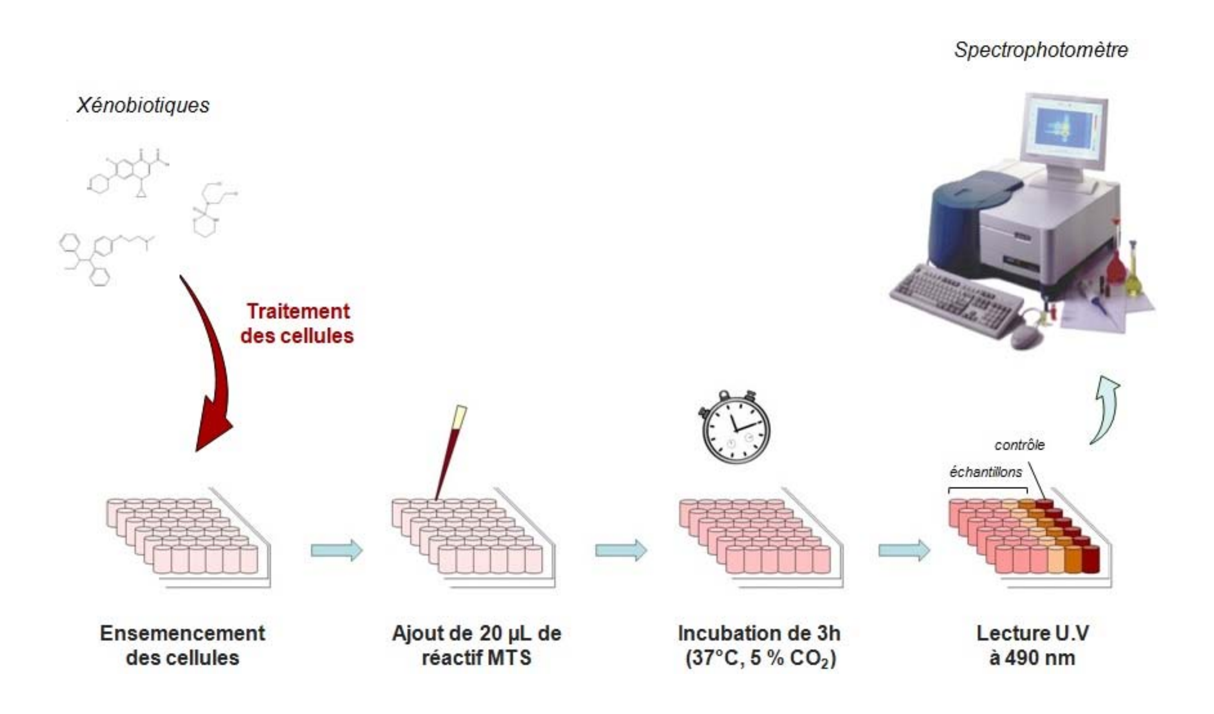


Figure 18 : Etapes du test de viabilité cellulaire (MTS).

<u>Mesure du taux d'inhibition de la croissance cellulaire</u>

Les analyses sont effectuées en triplicata de 5 points de mesures. Les résultats représentent les moyennes des valeurs médianes obtenues, et sont calculés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport à la condition contrôle (cellules sans traitement):

$$\% \text{ inhibition de la viabilité} = \left[\frac{D.O_{490nm} \text{ cellules traitées}}{D.O_{490nm} \text{ cellules contrôles}} \right] \times 100$$

I.5.3. Test des comètes sur cellules humaines

I.5.3.a. Produits utilisés

Lames non lavées et lamelles, le Na_2EDTA, le triton X-100, le Trizma base, le NaOH, le NaCl, le DMSO, le Na-Lauroyl Sarcosinate, l'agarose « Low Melting Poin » (LMP), l'agarose « Normal Melting Poin » (NMP) et le bromure d'éthidium (BET) proviennent de chez Sigma (Saint Quentin, France). Le PBS (sans Ca^{2+}, Mg^{2+}) est fourni par Life technologies (Saint Aubin, France).

I.5.3.b. Principe

Le test des comètes, aussi appelé « Single Cell Gel Electrophoresis » (SCGE), est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose où des cellules ayant été exposées à des xénobiotiques y sont incluses (figure 19). Cet outil permet de mesurer directement les cassures induites par un agent génotoxique, indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages, ou encore lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN (apoptose).

I.5.3.c. Protocole

Une vingtaine de lame de microscope sont préparées préalablement, après les avoir trempées dans un bain d'agarose NMP 1,6 % et laissées sécher sous la hotte.

Les cellules sont distribuées sur microplaques 12 puits, à raison de 1.10^5 cellules pour un volume final de 2 mL. Au terme du temps de traitement (24 h à 72 h), le milieu de culture est éliminé et 500 µL de trypsine sont ajoutés par puits (sous hotte, sans lumière). Les cellules sont récupérées dans 700 µL de milieu de culture complet (ou 700 µL PBS sans Ca ni Mg) puis distribuées dans des Eppendorfs. Les tubes sont centrifugés 5 min à 4000 rpm, 4°C, puis le surnageant est éliminé et les tubes mis à égoutter sur papier absorbant.
Pendant ce temps, de l'agarose NMP 0,8 % (85 µL) est déposée sur chaque lame, recouvert d'une lamelle, et laissé reposer sur la glace 5 min. La lamelle est retirée, les cellules sont alors resuspendues dans 170 µL d'agarose LMP 0,5 % et 85 µL sont déposés sur chacune des lames en duplicat, puis recouverts d'une nouvelle lamelle et laissées reposées 5 min sur la glace. Après avoir retiré les lamelles, une troisième couche d'agarose LMP 0,5 % est finalement déposée pour combler les « trous ».Les lames sont ensuite plongée dans un bain de lyse contenant de la solution mère de lyse (NaCl (2,5 M), Na_2EDTA (100 mM), Tris (10 mM), N-Lauroyl-sarcosinate, pH 10), du triton X-100 et du DMSO, et laissées en contact pendant 1h30 à 4°C. Le temps de contact doit rester le même entre les séries d'expérimentation afin de pouvoir comparer les résultats.

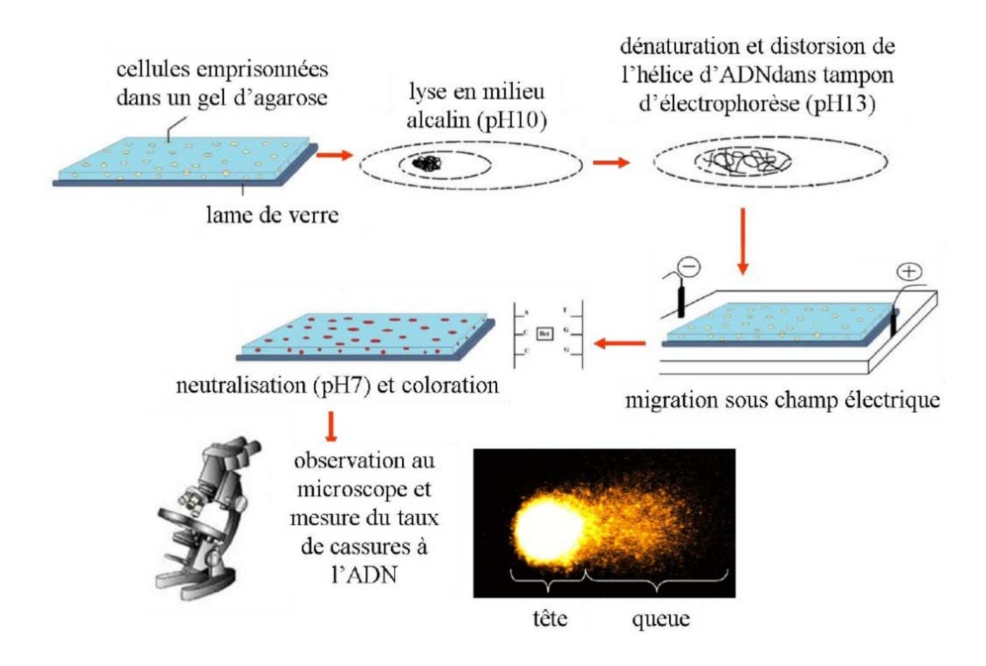


Figure 19 : Etapes du test Comète en condition alcaline (thèse C. Michel, 2011).

Au terme des 1h30, les lames sont retirées du bain de lyse, et disposées dans une cuve d'électrophorèse contenant un tampon de dénaturation (NaOH (300 mM), Na_2EDTA (1 mM), pH > 13) et en les orientant dans le sens de passage du courant. Les cellules sont laissées à dénaturer 20 min, 4°C, puis soumises à une électrophorèse de 20 min (26 V, 350 mA), 4°C, dans le même tampon. Après migration, les lames sont récupérées délicatement, égouttées et neutralisées par trois lavages

successifs (5 min d'intervalles) avec 500 µL de tampon Tris 0,4 M. Les lames sont alors plongées dans du méthanol pur, puis laissées sécher une nuit à température ambiante.

Lors de la quantification des cassures à l'ADN des lames, 50-75 µL de bromure d'éthidium (40 µg/mL) sont déposés sur la lame et recouverts d'une lamelle. Une cinquantaine de noyaux sont analysés à un grossissement x250 à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Olympus BX50) équipé d'un filtre d'excitation de 515-560 nm et d'une caméra pour prendre photographies des lames. Les images obtenues sont finalement analysées avec le logiciel Komet 5.5 (Andor™ Technology).

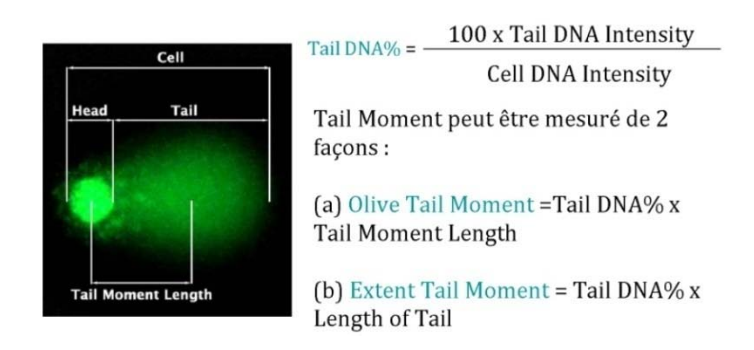


Figure 20 : Paramètres de quantification des dommages à l'ADN.

Les résultats du test comète peuvent être exprimés de plusieurs manières : la distance de migration de l'ADN, l'intensité de fluorescence de la tête et la queue de la comète ainsi que la distance entre le centre de gravité de chacune d'elle (figure 20). Parmi les paramètres les plus utilisés, on retrouve le « Tail DNA » qui correspond au pourcentage d'ADN dans la queue de la comète, le « Tail Moment », et l' « Olive Tail Moment » qui correspond au pourcentage d'ADN dans la queue de la comète multiplié par la distance séparant les centres de la queue et de la tête. Les résultats obtenus au cours de l'étude représentent les moyennes des valeurs médianes de « Tail DNA » mesurés.

I.5.4. Technique de post-marquage au ^{32}P des adduits à l'ADN

I.5.4.a. Produits utilisés

I.5.4.a.1. Les produits chimiques

Les produits chimiques utilisés sont dits de qualité « pour analyse ». Le Phosphate de Sodium Dihydraté (NaH_2PO_4, $2H_2O$), l'Urée, l'Hydroxyde de Lithium (LiOH), la soude, l'acide chlorhydrique, l'acide formique, l'acétate de potassium, le SDS (sodium dodécyl sulfate), l'isopropanol et l'éthanol proviennent de VWR International (Fontenay sous bois, France). La bicine, le chlorure de magnésium ($MgCl_2$), le dithiothréitol (DTT), la spermidine, le chlorure de sodium (NaCl), l'EDTA, le Tris, le Trizmabase, le triton X-100, le sucrose proviennent de Sigma (St Quentin Fallavier, France). Le $\gamma^{32}P$-ATP (6000 Ci/mmole, 10 µCi/µL) provient de Perkin Elmer (Germany). Le Roti-phénol (phénol saturé en Tris-HCl) provient de Roth-Sochiel (Lauterbourg, France). La poudre de cellulose « MN 301 » vient de chez Macherey Nagel (Düren, Allemagne). La polyéthylèneimine (HCl à 5 %) Corcat PEI P 600xE est fournie par CORCAT (Virginia Chemicals, Portsmouth, VA, USA).

I.5.4.a.2. Les enzymes

La phosphodiestérase bovine de rate (SPD) (P 9041), la nucléase de staphylocoque (MN) (N 3755), la protéinase K (P 6556), la ribonucléase T1 (RNAse T1) d'Aspergillus (R 1003) et la Ribonucléase pancréatique de bœuf (RNAse A) (R 4875) sont fournies par Sigma chimie (St Quentin Fallavier, France). La nucléase P1 (236 225) (*Penicillium citrinum*) et la T4 polynucléotide kinase (R838 292) proviennent de Roche Diagnostic (Meylan, France).

I.5.4.a.3. Matériels de chromatographie

Les plaques de polyéthylène-imine-cellulose (PEI) sont préparées au laboratoire. Le support en plastique 130 cm x 20 cm provient de chez France Plastics (Lyon, France). Soixante-treize grammes de cellulose sont mélangés à 48 mL d'une solution de polyéthylène-imine-HCl à 5 % et 500 mL d'eau distillée. L'étaleur (Desaga Heidelberg, Allemagne) sert à couler le mélange, après dégazage sous vide, sur les supports plastiques. Les plaques sèchent à température ambiante pendant environ 16 h. Elles sont ensuite découpées au format 18 cm x 26 cm, lavées au méthanol (1 minute) et rincées dans deux bains d'eau distillée puis séchées à température ambiante. Les plaques sont découpées aux dimensions 18 cm x 13 cm et sont stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

Le papier Whatman n°1 provient de Whatman international Ltd (Maidstone, England). Pour les autoradiographies, on utilise des films de radiographie Kodak de 20 cm x 40 cm, le révélateur Kodak LX24 et le fixateur Kodak AL4 à 20 % (hexamed, France). Les microtubes (1,5 et 2 mL) proviennent d'Eppendorf (Hamburg, Allemagne). Ils sont lavés au méthanol puis rincés deux fois à l'eau distillée avant utilisation.

I.5.4.a.4. Les adduits standards

Un contrôle négatif est réalisé lors de chaque post-marquage à partir d'ADN dépourvu d'adduits. Pour cela on utilise une solution d'ADN de sperme de saumon purifié. Deux µL de cette solution (soit 7 µg d'ADN) sont marqués lors de chaque analyse.
Un contrôle positif est également utilisé à partir d'adduits de BaP sur cellules de poisson marqué radioactivement dans les mêmes conditions que nos échantillons. L'utilisation de ces contrôles est primordiale pour valider le marquage.

I.5.4.b. Principe

La détection directe des adduits à l'ADN par la méthode du post-marquage au ^{32}P est une méthode fine et extrêmement sensible, qui permet de mettre en évidence le caractère génotoxique d'une substance. Au laboratoire, nous utilisons une version modifiée de la méthode initiale (Randerath *et al.*, 1981) qui peut atteindre une sensibilité de 1 adduit par 10^{10} nucléotides (Reddy & Randerath, 1986). Elle comporte les étapes suivantes (figure 21) :

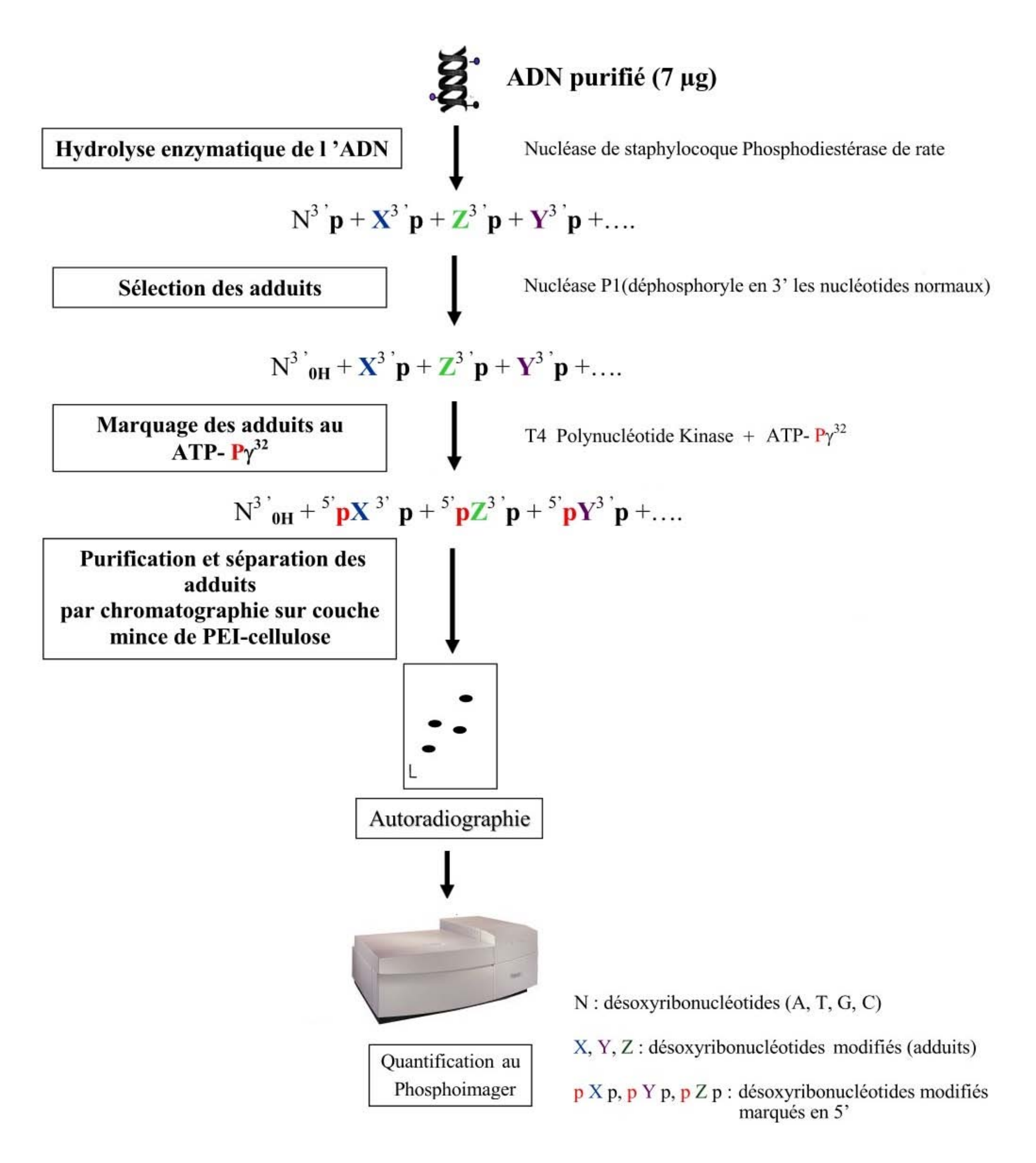


Figure 21 : Principe de la méthode du post-marquage au ^{32}P.

- Après extraction et purification de l'ADN, celui-ci est **hydrolysé** en désoxyribonucléosides 3'-monophosphate par deux enzymes, une endonucléase (nucléase de Staphylocoque) et une exonucléase (Phosphodiestérase de rate). A cette étape le milieu réactionnel contient un mélange de nucléotides normaux et modifiés (les adduits).
- S'en suit une étape de **sélection des adduits** qui est classiquement appelée « enrichissement » à la nucléase P1. Elle consiste, par l'activité 3'phosphatasique de la nucléase P1, à couper le phosphate en 3' des nucléotides normaux. Il s'agit d'une activité de déphosphorylation sélective des désoxyribonucléotides normaux. La configuration structurale de l'adduit protège la liaison du phosphate en 3' qui sera ensuite conservé dans les adduits.

- On réalise alors un **marquage enzymatique spécifique des adduits**. Les 3' P-nucléotides sont substrats de la polynucléotide kinase T4, qui a pour propriété de transférer un phosphate radioactif en position γ du [^{32}P]ATP sur la position 5' du nucléotide. Les nucléosides normaux ne pouvant pas être phosphorylés, ils n'interfèrent donc pas sur le marquage.
- Les nucléosides normaux et l'excès de phosphate inorganique sont séparés du ou des différents adduits par migration sur plaque de couche mince de polyéthylèneimine cellulose dans des solvants aqueux salins ; ils permettent la migration des substances hydrophiles, alors que les adduits hydrophobes restent au point d'origine, ou migrent légèrement selon leur degré d'hydrophobicité.
- Les adduits sont alors séparés par **chromatographie bidimensionnelle échangeuse d'anions**, sur plaque de couche mince de polyéthylène-iminecellulose, dans un système de solvants basés sur les propriétés chimiques des molécules adduitées.
- Les adduits et leur emplacement sont visualisés par **autoradiographie** des plaques sur des écrans amplificateur qui deviennent alors le support du travail de l'analyse. La radioactivité des plaques est scannée sur Bioimager (Typhoon), puis la quantification des spots radioactifs correspondant aux adduits de l'autoradiogramme est réalisée grâce au logiciel Ambis (CSP incorporation, Billerica, USA).

I.5.4.c. Protocole

I.5.4.c.1. Extraction de l'ADN

Cette étape consiste à casser les membranes des cellules afin de libérer l'ADN des noyaux. L'extraction se fait à froid dans de la glace pour limiter l'activité des DNAses cellulaires et ainsi préserver l'intégrité de l'ADN. Pour ce faire, 3 flasques de cellules correspondant au même traitement sont plongées dans un bac de glace pour figer l'état cellulaire et éviter la dégradation de l'ADN. Le tapis cellulaire est gratté deux fois avec des grattoirs dans 4 mL de SET (NaCl (5 M), EDTA (0,4 M), TRIS (2 M), pH 8). Les fractions contenant les cellules des trois boites sont récoltées dans un tube de 50 mL et centrifugées 10 min à 4°C à 2400 rpm (Sigma 3k10). Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans 700 µL de SET à 4°C puis transvasé dans un micro-tube de 2 mL. Cent µL de SDS à 20 % sont ajoutés à l'échantillon qui est ensuite incubé 10 min à 65°C pour casser les membranes. Les protéines sont alors précipitées par ajout de 800 µL d'acétate de potassium (6 M, pH 5) pendant 30 min dans la glace. L'échantillon est centrifugé 25 min, 0°C, à 13.000 rpm (Sigma 1K15), puis le surnageant est éliminé et les acides nucléiques sont resuspendus dans de l'éthanol froid pur (-20°C).

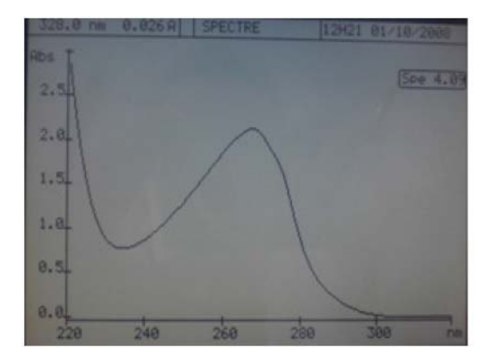
I.5.4.c.2. Purification de l'ADN

L'ARN est éliminé par l'action de RNAses. Dans un premier temps, le mélange de RNAse A à 20mg/mL, et de RNAse T1 à 10000 UI/mL est dissous dans de l'eau ultra pure. Le mélange est mis à bouillir à 100°C pendant 15 min pour détruire les DNAse. On rajoute 10 µL du mélange de Rnases.

L'ensemble est incubé une heure supplémentaire à 37°C. Pour détruire les protéines, 25 µL de Protéinase K à 20 mg/mL dissous dans du SET sont ajoutés au mélange qui est incubé une heure à 37°C. La purification de l'ADN se poursuit par ajout de 500 µL (1 Volume) de Rotiphénol® (Roth Sichel : phénol saturé en tris pH 8). Le mélange est agité mécaniquement pendant 20 min. Le mélange est centrifugé à 13.000 rpm pendant 15 min à 15°C (Sigma 1K15). Le surnageant est récupéré dans des microtubes. Cinq cents µL de SEVAG (24v Chloroforme/1v Alcool isoamylique) sont ajoutés au surnageant. On agite 20 secondes puis on centrifuge 5 min à 13.000 rpm (Sigma 1K15). Le surnageant, qui doit être limpide, est récupéré. Deux volumes d'éthanol froid pur (-20°C) et 50 µL d'acétate de sodium (3 M) sont ajoutés. Les pelotes apparaissent immédiatement. Les solutions d'ADN sont laisser 1 nuit à –20°C.

I.5.4.c.3. Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN

Les solutions d'ADN sont mises 15 min au bain marie à 37°C avant lecture au spectrophotomètre (Secomam, Anthelie advanced 5) afin d'avoir une solution homogène. L'intégralité de l'échantillon est transférée dans des cuves en quartz de 1 mL de contenance. La pureté et la quantité d'ADN en solution sont évaluées en faisant un spectre entre 220 et 320 nm. Le maximum d'absorption de la molécule d'ADN se situe entre 258 et 260 nm. Un déplacement du maxima d'absorption vers 250 nm ou 280 nm indique une contamination de l'ADN par de l'ARN, ou par des protéines respectivement (figure 22). Par conséquent la purification de cette solution doit être renouvelée.



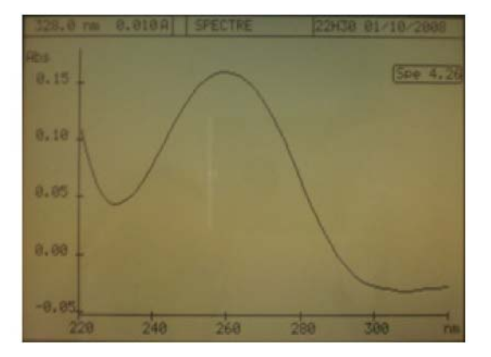


Figure 22 : Spectre d'ADN contaminé en protéines (photo de gauche) et d'ADN pur (photo de droite).

La quantité d'ADN de l'échantillon est calculée en considérant que 1 unité d'absorbance équivaut à 50 µg/mL. Des aliquotes contenant 4 µg d'ADN sont préparés à partir de la solution mère d'ADN et sont ensuite séchés à l'aide d'une centrifugeuse à évaporation sous vide (« Speedvac concentrator » de Savant). A partir de cette étape, l'aliquote d'ADN est prêt à être hydrolysé en vue du marquage.

I.5.4.c.4. Marquage des adduits

I.5.4.c.4.1. Hydrolyse de l'ADN

L'ADN (4µg) est séché et hydrolysés 4 h à 37°C en nucléosides-3'-monophosphates par actions de la phosphodiestérase de rate et de la nucléase de staphylocoque, dans 10 µL de mélange réactionnel suivant :

- 0,47 µL de phosphodiestérase de rate (2 mg/mL)
- 1 µL de nucléase de Staphylocoque (3,2 mU/µg d'ADN)
- 2 µL de tampon succinate (200 mM)/$CaCl_2$ (100 mM), pH 6
- 6,53 µL H_2O ultra pure.

I.5.4.c.4.2. Enrichissement à la nucléase P1

L'ADN hydrolysé est incubé 45 min à 37°C après avoir rajouté 5 µL du milieu réactionnel suivant :

- 1,5 µL de nucléase P1 (4 mg/mL)
- 1,6 µL de $ZnCl_2$ (1 mM)
- 1,6 µL Acétate de Na (0,5 M, pH 5)
- 0,3 µL H_2O ultra pure

La réaction est stoppée par l'ajout de 3 µL de Tris base (500 mM).

I.5.4.c.4.3. Marquage des adduits au ^{32}P en position 5'

Après enrichissement à la nucléase P1, les échantillons sont incubés 45 min en « salle chaude » (salle radioactive) à 37°C en ajoutant 5 µL de mélange réactionnel suivant :

- 100 µCi de $\gamma^{32}P$-ATP préalablement séchés
- 2 µL de tampon bicine *
- 0,32 µL de polynucléotides kinase T4 (10 UI/µL)
- 2,68 µL d'H_2O ultra pure

* tampon bicine : 500 µL de bicine 800 µM, 500 µL de dithiothréitol (DTT) 400 mM, 500 µL de $MgCl_2$ 400 mM, 55 µL de spermidine 400 mM, 445 µL d'eau distillée, pH 9,8 ajusté avec de la soude.

I.5.4.c.4.4. Test d'efficacité de l'hydrolyse

De l'ADN hydrolysée est prélevés (2 µg) et dilués (x 1200) dans de l'eau ultra-pure. Cinq µL de cette solution est incubé 1 h à 37°C avec 8 µL d'eau ultra pure et 5 µL du mélange réactionnel suivant :

- 100 µCi de $\gamma^{32}P$-ATP préalablement séchés
- 2 µL de tampon bicine *
- 0,32 µL de polynucléotides kinase T4 (10 UI/µL)
- 2,68 µL d'H_2O ultra pure

Après une heure d'incubation, la totalité du volume réactionnel est complété jusqu'à 300 µL par de l'eau ultra pure, soit 282 µL, puis 3 µL sont prélevés et déposés sur une plaque de PEI-cellulose de 18 cm de long. Celle-ci est mise à migrer 1h30 dans du tampon à 250 mM de $(NH_4)_2SO_4$ et 40 mM de NaH_2PO_4. La plaque est ensuite séchée, exposée 40 min à température ambiante puis autoradiographiée.

I.5.4.c.4.5. Test d'efficacité de l'enrichissement

Les gouttes résiduelles restantes dans le tube de marquage après dépôt sur la plaque sont diluées dans 50 µL d'eau ultra-pure. Cinq µL de ce mélange est prélevé et déposé sur une plaque de PEI cellulose de 18 cm de long. Celle-ci est mise à migrer 1h30 dans du tampon à 250 mM de

$(NH_4)_2SO_4$ et 40 mM de NaH_2PO_4. La plaque est ensuite séchée, exposée 40 min à température ambiante puis autoradiographiée.

Ce test permet de savoir si l'hydrolysat d'ADN a bien été enrichi en adduits par le traitement avec la nucléase P1 qui catalyse la déphosphorylation en 3' des nucléotides normaux. Ceux-ci ne sont plus des substrats de la polynucléotide kinase et ne doivent donc pas être marqués au ^{32}P pendant le marquage des adduits à l'ADN. Sur le film d'autoradiographie, les bases de l'ADN ne doivent être que d'une très faible intensité.

I.5.4.c.5. Séparation des adduits par chromatographies bidimensionnelles sur couche mince PEI-cellulose

Plusieurs chromatographies (figure 23) sur des plaques de PEI cellulose sont nécessaires afin de séparer les adduits selon leurs propriétés chromatographiques selon l'ordre suivant :

A) Dépôt des échantillons et purification des adduits (Dimension 1)

A l'extrémité de chacune des plaques de cellulose de 18 cm x 13 cm, est agrafé un papier Whatman n°1 de 20 cm de longueur. Chaque plaque est prévue pour recevoir six dépôts d'échantillons, espacés entre eux de 2 cm. La migration dure 16 h dans du phosphate monosodique (3 M, pH 5,7) pour la séparation des adduits. Ce solvant ne permet pas la migration des adduits, qui étant hydrophobes, restent au point de dépôt. Par contre, l'excès d'ATP et les nucléotides normaux sont éliminés. Une fois la migration terminée, la bande de papier est jetée et la plaque est lavée deux fois 5 min dans de l'eau distillée sous agitation. Une autoradiographie des plaques (20 min en salle obscure, révélation, rinçage à l'eau distillée, fixation et rinçage à l'eau distillée) permet de vérifier la pureté de l'échantillon.

B) Transfert et migration bidimensionnelle pour la séparation des adduits (Dimension 2)

Cette étape permet de transférer le dépôt sur une plaque de cellulose de 18 cm x 13 cm et de faire migrer les adduits dans le sens vertical de la plaque. Les points de dépôt sont découpés de la plaque de D1 et le transfert sur la plaque D2 se fait par contact « cellulose à cellulose » (les deux parties de cellulose sont maintenues par des aimants). La migration est amorcée dans de l'eau distillée et les plaques sont ensuite placées dans des cuves avec 70 mL de solvant (Urée 7,7 M, formate de Li 4,8M, pH 3,5). La migration dure environ 4 h à 25°C. Les plaques sont ensuite lavées deux fois à l'eau distillée pendant 5 minutes, séchées puis découpées à la dimension 16 cm x 13 cm.

C) Migration (Dimension 3)

La migration D3 s'effectue dans le sens perpendiculaire à la migration D2 (1/4 dans les sens inverse des aiguilles d'une montre) et permet de déplacer les adduits dans le sens de la largeur de la plaque. Une bande de papier Whatman (16 cm x 2,5 cm) est agrafée dans le sens de la longueur de la plaque sur le bord de la plaque. La migration est amorcée dans un solvant D3' (NaH_2PO_4 0,7 M). Les plaques sont placées dans des cuves contenant 70 mL de solvant de migration (NaH_2PO_4 0,6 M, Urée 7 M, pH 6,4) à 25°C. La migration dure 3 h. Après avoir éliminé le papier Whatman, les plaques sont lavées deux fois à l'eau distillée pendant 5 min puis séchées.

D) Migration (Dimension 4)

La migration D4 est dans le même sens que la migration précédente. Il s'agit essentiellement d'un lavage permettant d'éliminer la radioactivité non spécifique et donc de réduire le bruit de fond. Une bande de papier Whatman (16 cm x 4 cm) est agrafée dans le sens de la largeur de la plaque. La migration dure une nuit dans 70 mL de phosphate monosodique (NaH_2PO_4 1,7 M, pH 6) à 25°C. Après avoir enlevé le papier Whatman, les plaques sont lavées deux fois 5 min à l'eau distillée puis séchées et découpées au format 9,5 cm x 14,5 cm à partir de l'origine du dépôt.

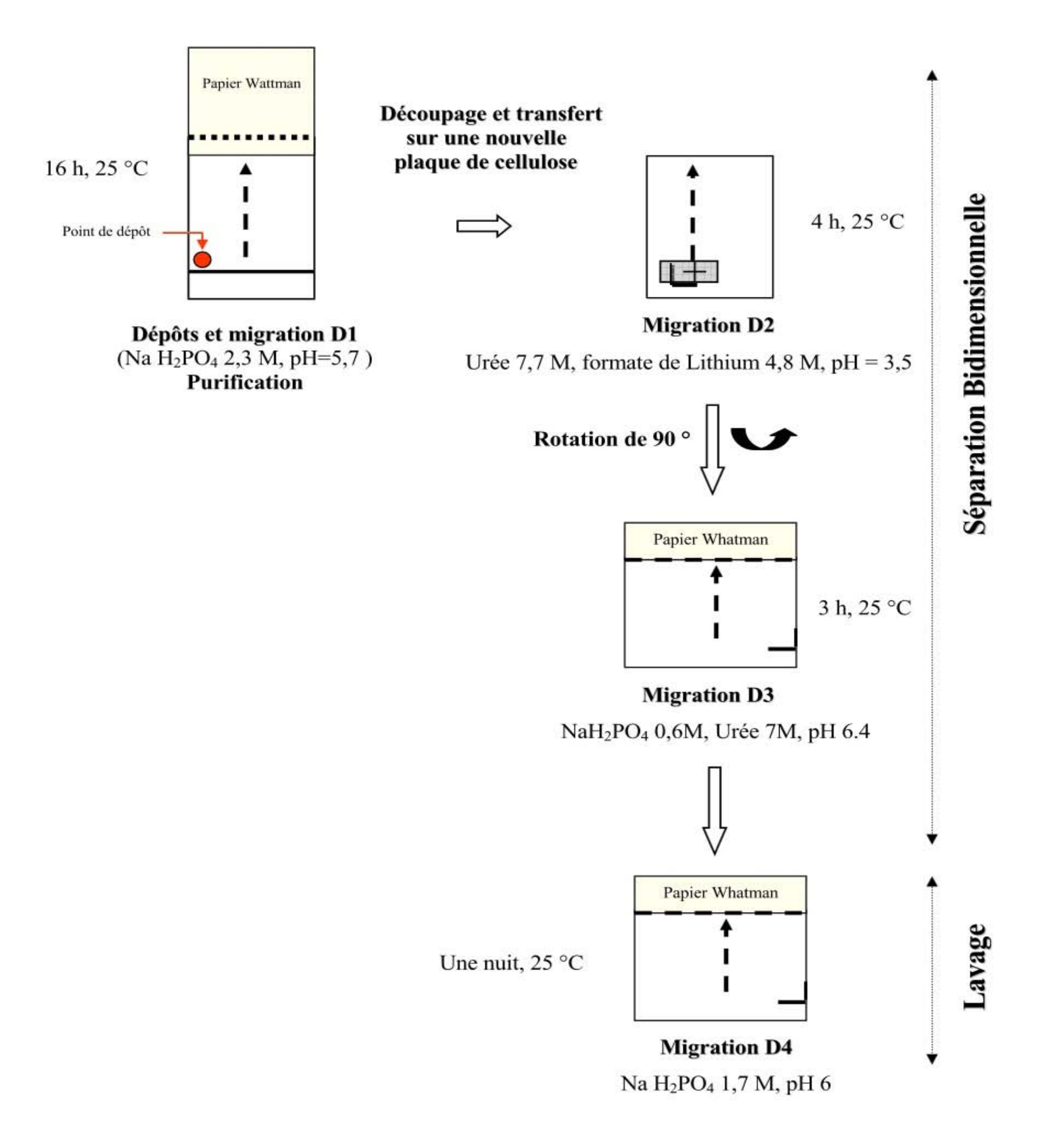


Figure 23 : Chromatographies successives pour la purification et la séparation des adduits sur des plaques dePEI-cellulose.

I.5.4.c.6. Autoradiographie et quantification des adduits

Les plaques obtenues en fin d'expérimentation sont autoradiographiées pendant une nuit (17 h) à l'aide d'écrans photostimulables (appelés cassettes). Le nombre de molécules radioactives peut être déterminé en mesurant la quantité de leur produit de décomposition. Le radio-isotope ^{32}P émet, en se

désintégrant, des particules β, ayant des forts niveaux d'énergie, qui peuvent être facilement mesurées. Les méthodes de mesure de ces particules se basent sur le nombre réel de désintégrations ("désintégrations par minute" ou DPM).
Pour connaitre le taux de radioactivité de nos échantillons et faire le comptage de nos adduits, une « règle » de radioactivité de 10, 50, 100, 250 et 500 dpm est réalisée à partir de la solution d'ATP radioactive, sachant que 1 Ci = 2,22.1012 dpm, et que 1 µL d'ATP* = 152 µCi x facteur de décroissance. Cette « règle de radioactivité » (ou gamme de dilution) est déposée sur une plaque de PEI-cellulose et mis à exposée dans les cassettes avec les échantillons.

Au terme du temps d'exposition, les écrans sont analysés à l'aide d'un phosphoimager (ou typhoon) mis à notre disposition par l'équipe Inserm « Interactions et profils d'Expression des Protéines » du CHU Rangueil à Toulouse. Cet appareil permet de détecter un signal fluorescent, chimio-luminescent ou radioactif de différents isotopes (^{32}P, ^{33}P, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{3}H avec écrans spéciaux), et il est doté du logiciel d'analyse « IMAGE Quant TL » pour l'analyse des images.

Le nombre d'adduits est calculé en fonction de la radioactivité mesurée, de l'activité spécifique et du facteur de décroissance de l'ATP radioactif utilisé, ainsi que de la quantité d'ADN marqué (pour plus d'informations sur les calculs, voir thèse V. Marquis, 2005).

I.6. Traitement statistique des données

L'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire de thèse ont été déterminés à partir de « n » essais indépendants. Pour chaque essai, la toxicité des différents échantillons testés a été mesurée en triple, tout comme pour la condition contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne de valeurs et données avec leurs écarts types.
Concernant plus particulièrement les essais standardisés, le traitement statistique des données a été fait selon les recommandations et procédures relatifs à chaque test. Dans le but de vérifier l'homogénéité ($\alpha = 0,05$) des différentes données obtenues, les valeurs des échantillons et du témoin ont été comparées par une analyse de la variance à un facteur à l'aide d'un logiciel disponible au laboratoire. Le test post-hoc de Fisher de comparaison avec la condition contrôle a ensuite été appliquée pour déterminer les valeurs significatives. Ainsi, les résultats sont considérés significatifs lorsque la probabilité pour la comparaison de l'échantillon avec le témoin négatif était inférieure à la valeur 0,05. Pour ce qui est de l'analyse des résultats obtenus à partir des lignées cellulaires humaines, le test post-hoc de Dunnett's a été utilisé pour les mêmes raisons. Les résultats sont considérés significatifs lorsque la probabilité pour la comparaison de l'échantillon avec le témoin négatif était inférieure à la valeur 0,05 et très significatif lorsqu'inférieure à la valeur 0,01.

Enfin, dans le cas d'une analyse multiple de la toxicité, le test post-hoc de Kruskal-Wallis a été appliqué pour déterminer les différences entre échantillons. Les résultats sont considérés significatifs lorsque la probabilité pour la comparaison de l'échantillon avec le témoin négatif était inférieure à la valeur 0,05, et très significatif lorsqu'inférieure à la valeur 0,01.

Résultats & Discussions

Partie 1

Etude de la toxicité des molécules modèles ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide, à l'aide d'une batterie de bioessais et de biomarqueurs

Chapitre 1 : Impact de la ciprofloxacine, du tamoxifène et du cyclophosphamide, sur la viabilité d'organismes procaryotes et eucaryotes

Depuis plus d'une trentaine d'années des molécules pharmaceutiques sont détectées dans les effluents et les milieux aquatiques. Avec la manifestation d'évènements récents, comme la modification du sex-ratio chez certaines espèces aquatiques (Sonneschein & Soto, 1998 ; Tyler *et al*., 1998 ; Hinfray *et al*., 2010 ; pour une revue voir Cardoso *et al.,* 2014) ou l'apparition d'antibiorésistance chez certaines bactéries (Kümmerer *et al*., 2009 ; Li *et al.,* 2010 ; Kristiansson *et al.,* 2011 ; Xu *et al.,* 2014), la question de leur présence dans l'environnement s'impose aujourd'hui comme une priorité.

A l'heure actuelle, le nombre croissant de polluants issus de l'activité humaine a considérablement accru cet intérêt pour le développement des recherches sur le comportement et les impacts de ces molécules sur l'environnement et la santé humaine (Christensen, 1998 ; Schulman *et al*., 2002 ; Cardoso *et al.,* 2014). C'est pourquoi, l'utilisation d'outils simples et rapides représente une approche indispensable en écotoxicologie, afin d'évaluer les conséquences d'une exposition à court ou long terme d'organismes non-cibles (Deblonde *et al*., 2013). Par exemple, certaines micro-algues sont connues et utilisées en bioessais standardisés du fait de leur sensibilité aux contaminations dans les milieux aquatiques (Blaise & Couture, 1984 ; Eguchi *et al*., 2004 ; Tang *et* al., 2013 a, b). Elles sont considérées comme des bioindicateurs d'effets et d'exposition, de par leur rôle clé dans l'équilibre des écosystèmes aquatiques où elles sont impliquées à la fois dans la chaine alimentaire mais aussi dans la production d'oxygène (Ma *et al*., 2006). Cependant, le risque posé par les molécules cytostatiques présentes en mélange dans l'eau n'est pas assez documenté, et il est encore impossible de conclure sur leurs effets à long terme vis-à-vis d'organismes non-cibles (faune et flore confondus).

Cette première partie est consacrée à l'analyse comparée de la viabilité d'organismes procaryotes et eucaryotes exposés à de faibles doses de médicaments en solution. Plusieurs bioessais, dont certains sont standardisés et largement utilisés dans l'évaluation de la qualité de l'eau, ont été sélectionnés pour caractériser l'impact de trois médicaments selon qu'ils soient seuls ou en mélanges en solution.

De plus, contrairement à l'approche de base qui est généralement utilisée en écotoxicologie et qui permet le calcul de la concentration efficace médiane (EC_{50}), nous avons choisi de suivre l'approche du test de comparaison (ou d'inhibition) pour l'ensemble des tests utilisés. Cette deuxième approche moins courante consiste à comparer des mesures de la toxicité de plusieurs échantillons dont la toxicité respective est trop faible pour calculer les EC_{50}. Elle permet dans notre cas de comparer directement la sensibilité des essais et biomarqueurs entre eux, et d'appréhender les effets toxiques et interactions pouvant être induits par des doses environnementales de médicaments, ou des effluents bruts hosptaliers ou urbains.

I.1. Evaluation de la bioluminescence de la bactérie *V. fischeri* (Microtox®)

A l'heure actuelle, de nombreuses études utilisent le test Microtox® pour évaluer la toxicité aigüe d'un ou plusieurs polluants environnementaux vis-à-vis des bactéries (Kaiser, 1988). L'intérêt de ce bioessai basé sur la mesure de la bioluminescence de la photobactérie marine repose à la fois sur sa rapidité et sa relative facilité d'exécution. L'intégrité du métabolisme cellulaire, et par conséquence l'intensité lumineuse, permet d'évaluer très simplement l'induction d'un stress de toxicité. Cette méthode présente également l'avantage d'être standardisée (NF EN ISO 11348-3, 1999) permettant ainsi de comparer les résultats obtenus dans les laboratoires du monde entier.

L'extinction de la bioluminescence a ainsi été mesurée chez *V. fischeri* exposée à différentes concentrations de ciprofloxacine (CIP), tamoxifène (TAM) et cyclophosphamide (CP). Les résultats (3 séries en triplicata) obtenus après 30 min d'exposition sont présentés dans la figure 24. Un contrôle positif utilisant du sulfate de cuivre ($CuSO_4$) a été réalisé en parallèle pour vérifier le bon état physiologique des bactéries avant le test (données non présentées ; inhibition > 90 %). Le contrôle négatif présenté dans les figures suivantes correpond aux bactéries n'ayant pas reçu de traitement. Par ailleurs, les résultats obtenus après 5, 15 et 30 min d'exposition présentant les mêmes tendances, seules les valeurs les plus importantes mesurées à 30 min sont présentées dans les figures 24 et 25.

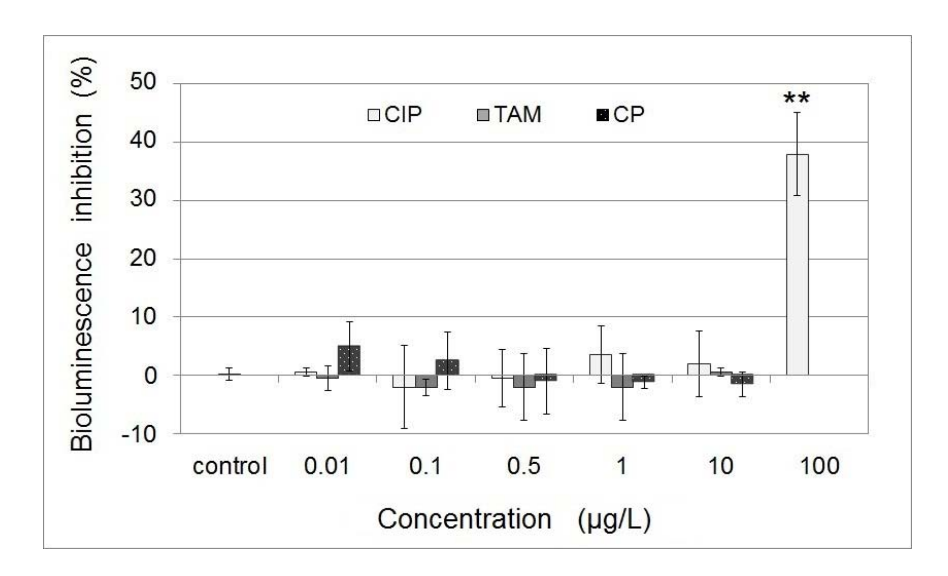


Figure 24 : Inhibition de la bioluminescence chez la bactérie *Vibrio fischeri* exposée 30 minutes à différentes concentrations de ciprofloxacine (CIP ; blanc), tamoxifène (TAM ; gris) et cyclophosphamide (CP ; noir). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes et sont considérées statistiquement significatives à $p<0,05$ (*) et $p<0,01$ (**).

L'analyse des résultats présentés dans la figure 24 n'a pas permis de mettre en évidence une toxicité aiguë significative du tamoxifène et de la cyclophosphamide sur *V. fischeri*. Seule la concentration la plus élevée de ciprofloxacine (100 µg/L) induit une inhibition de la bioluminescence ($p<0,01$). Ce résultat n'est pas surprenant puisque la ciprofloxacine est un antibiotique.

Par contre, l'extinction de la bioluminescence mesurée chez la bactérie marine exposée 30 min à différents mélanges de médicaments révèle une toxicité aiguë (figure 25), mettant en évidence l'apparition d'une action coalitive des molécules pour les conditions 1 à 4. Pour la condition 5, la

réponse de toxicité des mélanges étant bien inférieur à celle mesurée avec 100 µg/L de CIP, les résultats font apparaitre un effet antagoniste des molécules.

Les effets induits par les mélanges binaires et ternaires de molécules se traduisent plus particulièrement par une dose-réponse non monotone reflétée par une courbe en U inversée. Ce type de phénomène appelé « hormèse » est caractéristique des perturbateurs endocriniens notamment. Il s'agit d'une réponse de type biphasique. Il y a pour les faibles doses d'exposition une amplification de la réponse puis une rediminution.

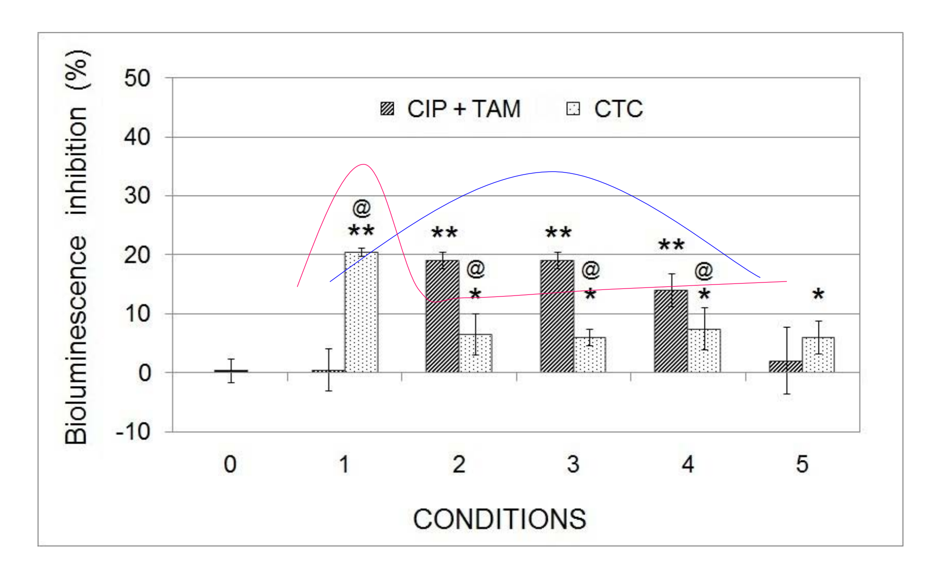


Figure 25 : Inhibition de la bioluminescence chez *Vibrio fischeri* exposée 30 minutes à différentes concentrations de mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP+TAM ; gris foncé) ou ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC ; gris clair). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes et sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) en comparaison aux cellules témoins non exposées ; @ différence significative (P<0,05) entre les expositions aux mélanges CIP + TAM et CTC.

L'exposition aux mélanges des plus petites doses de CIP et TAM (10 ng/L CIP + 10 ng/L TAM ; condition 1) n'entraine aucune toxicité. L'augmentation des doses (conditions 2, 3) induit une inhibition significative de la bioluminescence comprise entre 15 et 20 % (p<0,01). Cette inhibition diminue pour la condition 4 pour ne plus être observée aux plus fortes concentrations (100 µg/L CIP + 10 µg/L TAM ; condition 5).

Concernant les mélanges des trois molécules, on observe également une dose réponse en U, mais avec un décalage dans les doses. La réponse de toxicité décroit mais reste significative (p<0,05) par rapport au témoin lorsque les concentrations des molécules dans les mélanges augmentent. L'addition de cyclophosphamide aux mélanges binaires CIP + TAM entraine une réponse antagoniste. On constate notamment que l'addition de 10 ng/L CP au mélange de 10 ng/L CIP + 10 ng/L TAM entraine 20 % d'inhibition de la bioluminescence (p<0,01) alors qu'en mélange binaire il n'y avait aucun effet. Le CP joue donc le rôle de potentialisateur. A l'inverse, l'ajout de CP pour les conditions 2, 3 et 4 atténue la toxicité en diminuant presque de moitié l'inhibition de la bioluminescence. Le mélange des trois médicaments aux doses les plus fortes (condition 5) entraine une toxicité significative (p<0,05).

Enfin, il est important de souligner que là où un traitement de 100 µg/L CIP seul entraînait une inhibition de la bioluminescence de 40 % ($p<0,01$), l'addition de 10 µg/L TAM ou l'addition de 10 µg/L TAM + 10 µg/L CP (conditions 5) entraine dans les deux cas un effet antagoniste prononcé.

I.2. Evaluation de la croissance de l'algue *P. subcapitata* (Algaltox F™)

L'essaiest fondé sur l'inhibition de la croissance d'algues et consiste à mesurer la densité cellulaire après 72 h d'exposition à plusieurs dilutions de l'échantillon. L'incubation des algues est effectuée dans un système statique (sans renouvellement) et dans des conditions de température et de lumière contrôlées. Les réponses mesurées intègrent les effets de toutes les composantes chimiques, physiques et biologiques de l'échantillon pouvant affecter le potentiel de croissance de l'organisme et révélant ainsi leur toxicité vis à vis des végétaux aquatiques.

L'inhibition de la croissance de l'algue *P. subcapitata* (3 séries en duplicata) exposée à de la ciprofloxacine, du tamoxifène et du cyclophosphamide est présentée dans la figure 26. Un contrôle positif utilisant du dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) a été fait pour vérifier le bon état physiologique des algues avant le test (données non présentées ; inhibition > 95%). Le contrôle négatif présenté dans les figures suivantes correpond aux algues n'ayant pas reçu de traitement.

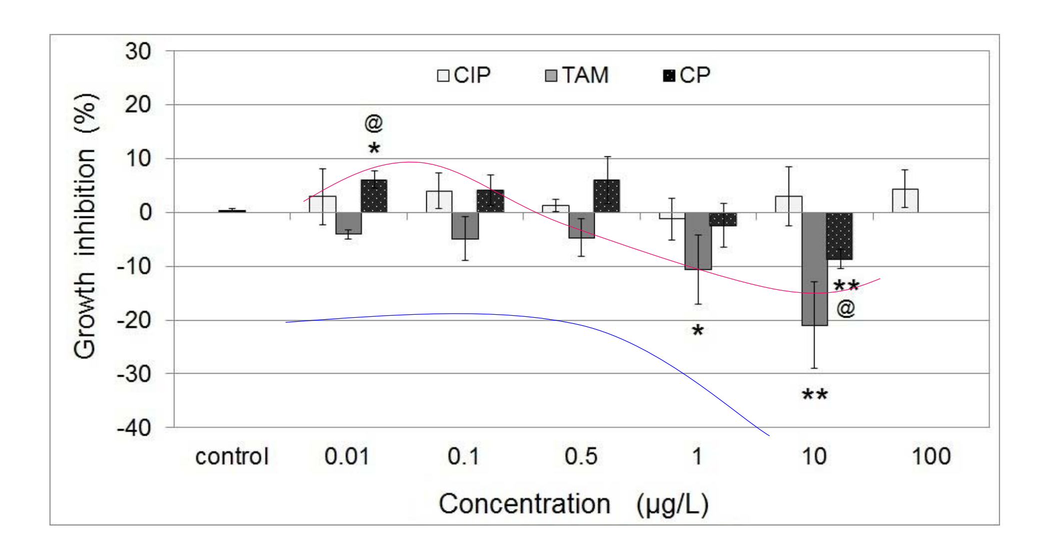


Figure 26 : Inhibition de la croissance d'algues *P. subcapitata* exposées 72 h à différentes concentrations de ciprofloxacine (CIP ; blanc), tamoxifène (TAM ; gris) et cyclophosphamide (CP ; noir). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes et sont considérées statistiquement significatives à $p<0,05$ (*) et $p<0,01$ (**) ; @ différence significative ($P<0,05$) entre les expositions au TAM et au CP.

Le tamoxifène entraine une stimulation dose dépendante de la croissance algale, significative ($p<0,05$) par rapport au témoin. Les algues exposées respectivement à 1 µg/L et 10 µg/L TAM présentent un taux de croissance supérieur de 10 % ($p<0,05$) et 20 % ($p<0,01$) par rapport au témoin.

L'exposition des algues au cyclophosphamide se caractérise par une dose-réponse non monotone reflétant une adaptation de la réponse de toxicité des algues selon la dose (hormèse, courbe en S). Le traitement des algues avec la faible concentration de 10 ng/L CP entraine une inhibition

significative de la croissance de l'ordre de 6 % (p<0,05), alors qu'à l'inverse une dose de 10 µg/L induit une prolifération des algues d'environ 10 % (p<0,01) par rapport au témoin.

Les concentrations intermédiaires de cyclophosphamide comprises entre 100 ng/L et 1 µg/L ne semblent pas induire de réponse de toxicité bien que les valeurs soient significativement différentes de celle obtenue pour un traitement de 10 µg/L. Aucun effet toxique n'a été mesuré avec la cirpofloxacine, quelle que soit la dose.

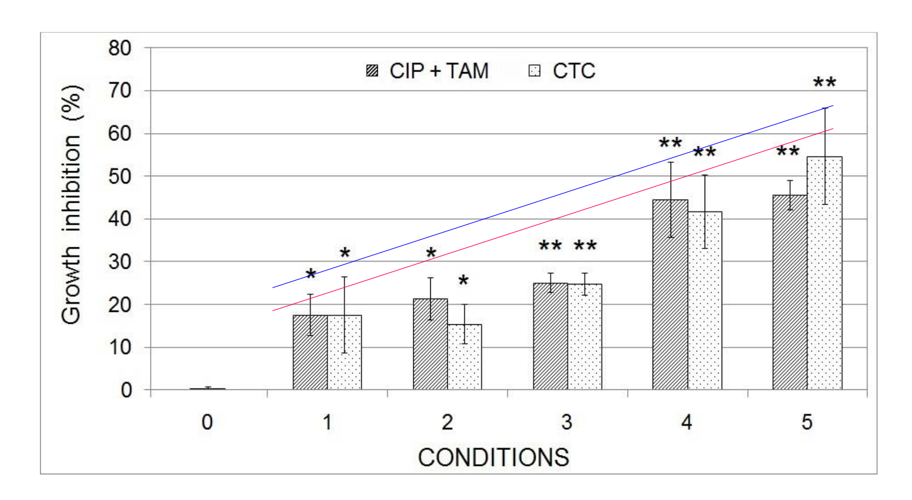


Figure 27: Inhibition de la croissance des algues *P. subcapitata* exposées 72 h à différentes concentrations de mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP+TAM, gris foncé) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC, gris clair). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes et sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

L'exposition des algues pendant 72 h aux différents mélanges de médicaments entraine une inhibition dose-dépendante de la croissance des algues reflétant une toxicité chronique (figure 27). De plus, on observe un effet de potentialisation aux petites doses, puisque les molécules n'entrainaient pas d'effet individuellement. Pour les concentrations plus importantes auxquelles le TAM engendrait une prolifération, on note un effet antagoniste qui se caractérise par une inversion de la réponse de toxicité. On notera également que la ciprofloxacine joue un rôle potentialisateur dans l'intensité de la réponse, puisque les valeurs absolues de toxicité sont à chaque fois plus importantes avec les mélanges CIP + TAM par comparaison avec les traitments de TAM seul. Les concentrations de l'ordre du nanogramme par litre induisent une inhibition moyenne de 20 % de la croissance (p<0,05), tandis que les plus fortes concentrations de l'ordre du microgramme par litre entrainent une inhibition supérieure à 40 % (p<0,01). La courbe de réponse de l'exposition des algues simultanément aux mélanges CIP + TAM + CP est quasiment identique à celle observée lors de l'exposition CIP + TAM. Ceci montre que l'addition de cyclophosphamide au mélange n'entraine aucun effet supplémentaire sur la croissance algale.

I.3. Evaluation de l'inhibition de la croissance de lentilles d'eau *Lemna minor*

Des cultures de lentilles d'eau (3 séries en triplacata) ont été exposées pendant 7 jours consécutifs à différentes doses de ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide. Au terme du temps d'exposition, le nombre de frondes a été mesuré pour chaque condition et comparé à la condition contrôle (figure 28). L'incubation des cultures est effectuée dans un système statique (sans

renouvellement) et dans des conditions de température et de lumière contrôlées. Les réponses mesurées intègrent les effets de toutes les composantes chimiques, physiques et biologiques de l'échantillon pouvant affecter le potentiel de croissance de l'organisme végétal aquatique.

Le tamoxifène, n'entraine aucune toxicité significative vis-à-vis de la croissance des lentilles d'eau exposées aux doses testées.

On observe que la ciprofloxacine induit une réponse de toxicité chronique dose-dépendante. Une exposition des lentilles d'eau à 10 ng/L CIP inhibe la croissance de 10 % (p<0,05). Cette inhibition peut atteindre 60 % lors d'une exposition à 100 µg/L.

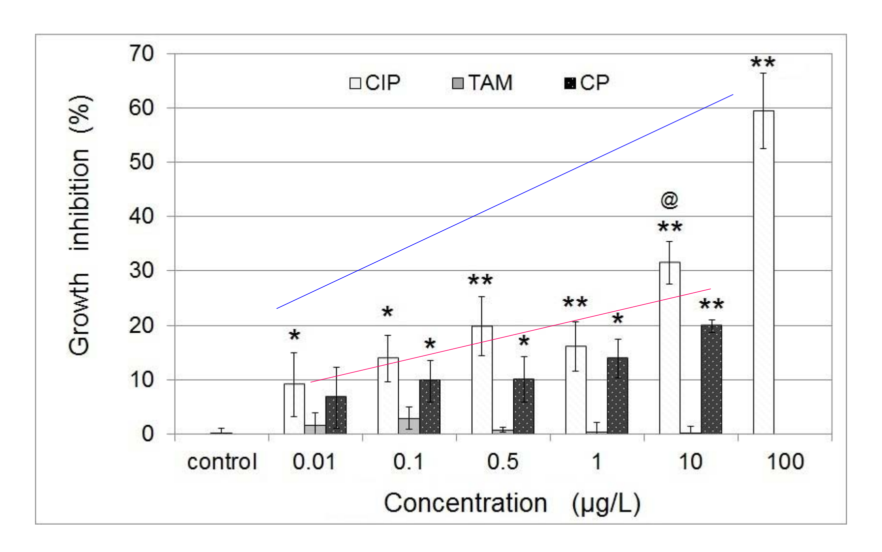


Figure 28 : Inhibition de la croissance de la lentille d'eau *Lemna minor* exposée 7 jours à différentes concentrations de ciprofloxacine (CIP ; blanc), tamoxifène (TAM ; gris) et cyclophosphamide (CP ; noir). Les résultats sont exprimés en moyennes et les valeurs sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) ; @ différence significative (P<0,05) entre les expositions CIP et TAM.

Le cyclophosphamide inhibe également de manière dose-dépendante la croissance des algues. Toutefois, à dose équivalente l'inhibition est beaucoup moins importante que pour la ciprofloxacine (20 % *versus* 30 %, respectivement). L'inhibition s'échelonne de 10 % (p<0,05) à 20 % (p<0,01) d'inhibition pour des doses comprises entre 100 ng/L et10 µg/L de cyclophosphamide. Le traitement 10 ng/L de CP n'entraine pas de réponse significative de la toxicité.

L'inhibition de croissance des lentilles d'eau exposées à différents mélanges binaires et ternaires de molécules est présentée dans la figure 29. L'exposition des lentilles aux deux types de mélanges de médicaments (binaires et ternaires) entraine une inhibition significative variant de 10 % à 60 % suivant les concentrations et le types de mélanges. L'inhibition de la croissance des lentilles d'eau exposées aux mélanges CIP + TAM se traduit par une courbe de dose-réponse non monotone (hormèse, courbe en S). Pour l'exposition aux faibles concentrations, on observe tout d'abord une inhibition significative d'environ 17 % alors qu'on n'observe pas de toxicité dans la condition 2, puis on note une inhibition dose-dépendante aux concentrations plus importantes (conditions 3, 4, 5).

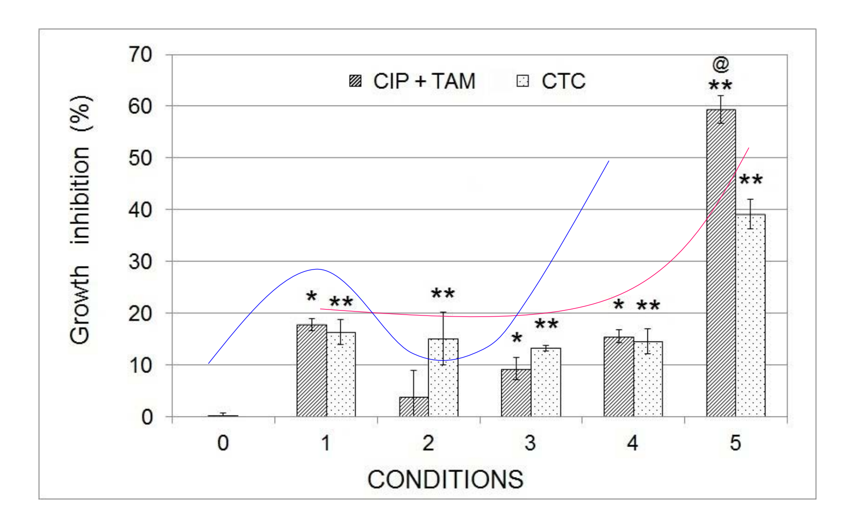


Figure 29 : Inhibition de la croissance de cultures de *Lemna minor* exposées 7 jours à différentes concentrations de mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP+TAM ; gris foncé) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC ; gris clair). Les résultats sont exprimés en moyenness et les valeurs considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) ; @ différence significative (P<0,05) entre les expositions aux mélanges CIP + TAM et CTC.

Lorsque le cyclophosphamide est ajouté au mélange, l'allure de la courbe dose-réponse est différente de celle observée lors de l'exposition aux mélanges binaires. Il y a peu de différence de toxicité en fonction des concentrations sauf pour le mélange aux plus fortes concentrations.

Le CP a un effet antagoniste. En effet, l'inhibition dans la condition 2 (faible concentrations) est significativement plus importante en présence de cyclophosphamide comparé au mélange binaire (15 % *versus* 0 %, respectivement). Dans la condition 5 (forte concentration), l'inhibition de croissance est nettement moins élevée comparé au mélange binaire (40 % *versus* 60 %, respectivement).

Les valeurs attendues de toxicité ont été calculées à partir de la toxicité respective des molécules affectant la viabilité des lentilles d'eau. De par les caractéristiques chimiques intrinsèques des molécules de l'étude, les 2 modèles de référence d'addition des concentrations (CA) et de l'action indépendante (IA) ont été utilisés pour tirer les modèles des effets conjugués en mélange et comparé ainsi les interactions (figure30 ; tableau 9) (Chou, 2006, 2011).

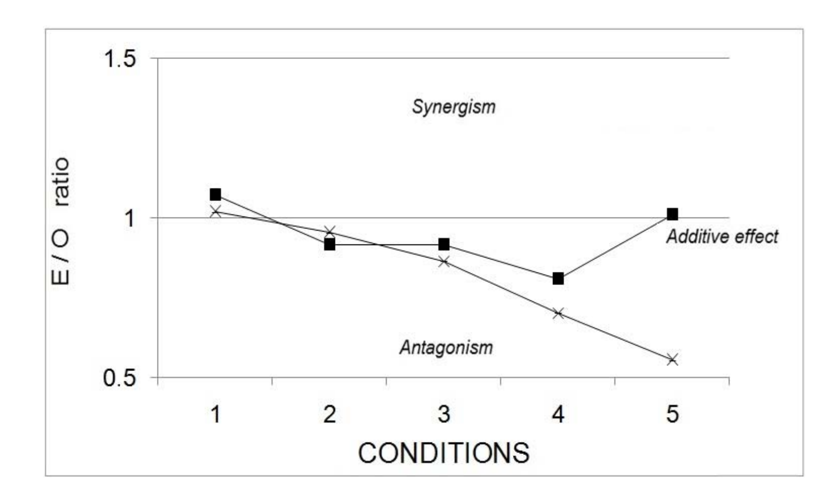


Figure 30 : Comparaison des ratios [valeur attendue (E) / valeur observée (O)] calculés pour des cultures de *Lemna minor* exposées 7 jours à différentes concentrations de mélange de ciprofloxacine + tamoxifène (■) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (X).

Si l'interaction entre les molécules est strictement additive, alors [1-E(Ca)] x [1-E(Cb)] = 1-E(C_{mix}), où E(C_A) est l'effet induit par le composé A seul, E(C_B) l'effet induit par le compose B seul et E(C_{mix}) est l'effet observé lorsque les 2 composés sont mélangés ensemble. En d'autre terme, si le ratio [valeur attendue (E) / valeur observée (O)] = 1 l'interaction est strictement additive, si le ratio est >1 l'interaction est synergique, et enfin si le ratio est <1 l'interaction est antagoniste.

Mélanges de molécule	**Condition**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
CIP + TAM $_{att.}$	89.42	86.53	83.28	68.24	40.68
CIP + TAM$_{obs.}$	83.44± 1.23	94.62 ± 6.91	91.1 ± 8.44	84.44 ± 1.21	40.3 ± 2.71
E/O	1.07	0.91	0.91	0.81	1.01
CTC $_{att.}$	83.46	78.09	74.97	58.75	32.58
CTC$_{obs.}$	81.97 ± 2.35	81.97 ± 1.84	86.73 ± 4.26	83.67±1.54	58.84±3.25
E/O	1.02	0.95	0.86	0.7	0.55

Tableau 9 : Comparaison entre les valeurs additives attendues et les résultats obtenus en % de culture de Lemna minor exposées pendant 7 jours à des mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP + TAM) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC). E/O représente le ratio entre valeur attendue (E) et valeur observe (O).

A partir de ces résultats, on constate tout d'abord qu'indépendamment du type de mélange testé les effets induits sont variables et dose-dépendants. En effet, on observe que les ratios E/O des mélanges CIP +TAM et CTC testés à la condition 1 induisent un effet synergique (ratios E/O> 1). Outre le mélange CIP + TAM (condition 5) qui révèle un effet s'apparentant à une interaction additive entre les molécules, toutes les autres conditions des mélanges entrainent des effets antagonistes (ratios E/O< 1). On observe aussi que les courbes CIP + TAM et CTC décrivent globalement la même tendance, et que le mélange CTC (condition 5) entraine un effet antagoniste marqué (E/O proche de 0,5).

De manière générale, on observe à partir du tableau 9 que les plus faibles concentrations (conditions 1) mélangées entres elles (CIP + TAM ; CTC) induisent une toxicité plus importante que celle attendue par les calculs, tandis qu'elle est à chaque fois beaucoup moins importante pour les autres conditions. On notera tout de même que seule la toxicité attendue et observée des concentrations de la condition 5 du mélange CIP + TAM sont elles quasiment identiques.
On constate que le TAM modifie la réponse du CIP seule, puisque l'inhibition est plus importante lors de l'exposition au mélange binaire comparé à l'exposition à la CIP seule. De plus, on peut souligner que l'ajout de faibles doses de CP en mélange induit des réponses variables elles aussi. La comparaison des conditions 1, 2 et 3 ne permet pas de mettre en évidence de différences significatives entre les mélanges CIP + TAM et CTC, tandis que l'ajout de CP dans les conditions 4 et 5 entraine un antagonisme d'autant plus prononcé que les concentrations augmentent.

I.4. Evaluation de la viabilité de cellules humaines (test MTS).

Nous avons exposé deux types de lignées cellulaires humaines, hépatique (HepG2) et mammaire (MCF-7), à différentes concentrations de nos molécules thérapeutiques seules ou en mélanges. L'entrée en apoptose des cellules ou leur mort par nécrose est reflétée par un ralentissement de l'activité métabolique. Le test MTS permet de mesurer cette baisse d'activité métabolique.

I.4.1. Evaluation de la viabilité des cellules hépatiques HepG2

I.4.1.a. Toxicité respective et en mélanges de la ciprofloxacine, du tamoxifène et du cyclophosphamide en doses croissantes

La viabilité des cellules hépatiques (HepG2) a été mesurée après 24 h (mimant une toxicité aiguë) et 72 h d'exposition (mimant une toxicité chronique) à des concentrations non thérapeutiques de ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide seuls ou en mélange. Les résultats sont respectivement présentés dans les figures 31 et 32, et sont exprimés en moyenne des valeurs de 15 mesures (triplicata de 5 points de mesure).

L'exposition des cellules à une doses de 10 ng/L de ciprofloxacine ou de tamoxifène réduit significativement la viabilité (p<0,01) (figure 31.A), et l'inhibition est temps-dépendante (figure 31.B). A 72 h, les doses de ciprofloxacine comprises entre 100 ng/L et 100 µg/L induisent une toxicité plus faible comparée à un traitement de 10 ng/L. L'exposition à une concentration 10 fois plus importante (100 µg/L) réduit significativement (p<0,01) la viabilité pour atteindre un taux de survie quasiment identique. Les pourcentages de cellules viables exposées à 100 µg/L de ciprofloxacine sont respectivement de 90 % et 80 % après 24 h et 72 h. Après 24 h d'exposition la courbe semble dessiner un S, cependant les écarts types enregistrés ne permettent pas de conclure avec certitude de l'apparition d'un phénomène d'hormèse. Par contre, cet effet est clairement observé à 72 h.

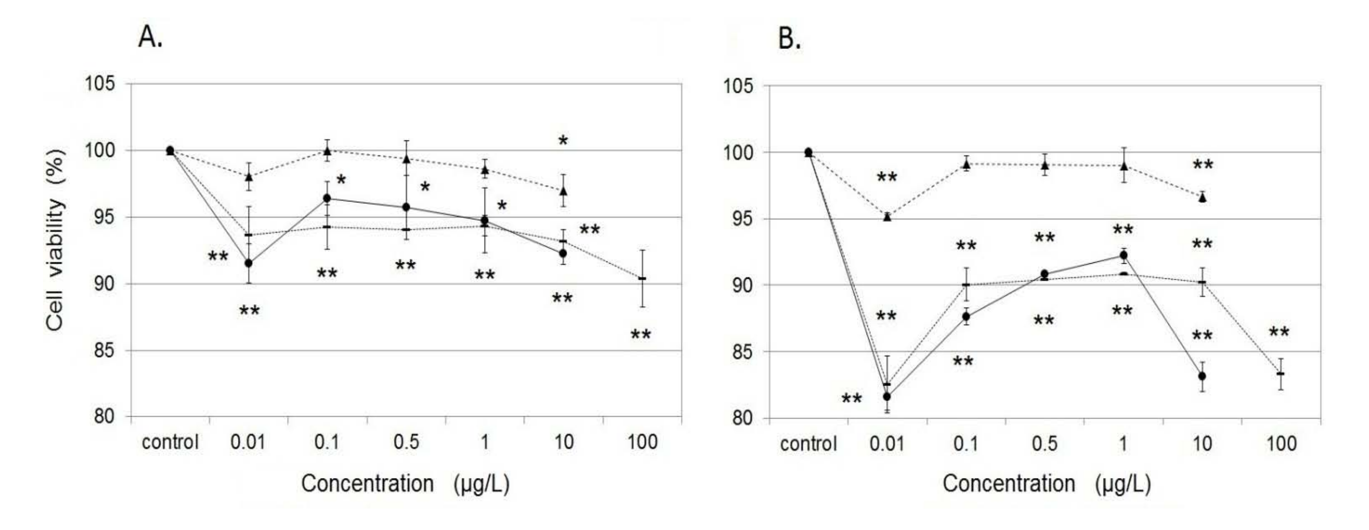


Figure 31 : Taux de survie des cellules hépatiques humaine HepG2 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes concentrations de ciprofloxacine (-), tamoxifène (●) et cyclophosphamide (▲). Les résultats sont exprimés en moyennes et les valeurs sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

Lorsque les cellules sont exposées au tamoxifène la courbe décrit également une dose-réponse non monotone (courbe en S) quel que soit le temps d'exposition. Ce phénomène d'hormèse est plus prononcé à 72 h et l'inhibition de la viabilité s'amplifie de 5 % pour les doses intermédiaires (100 ng/L - 1 µg/L) et de 10 % pour la plus faible (10 ng/L) et la plus forte (10 µg/L) dose testée. Bien que les courbes du tamoxifène et de la ciprofloxacine soient relativement semblables à 72 h, la plus forte dose de tamoxifène (10 µg/L) entraine une inhibition plus importante dela viabilité des cellules par rapport à un traitement identique de ciprofloxacine.

Enfin, quel que soit le temps d'exposition des cellules hépatiques au cyclophosphamide, une faible diminution (p<0,05) de la viabilité est observée pour la plus forte dose testée (10 µg/L) (figure 32.A, B). Une dose de 10 ng/L entraine aussi une toxicité significative (p<0,01) uniquement après 72 h (figure 32.B), et met en évidence l'apparition d'une courbe en U (hormèse).

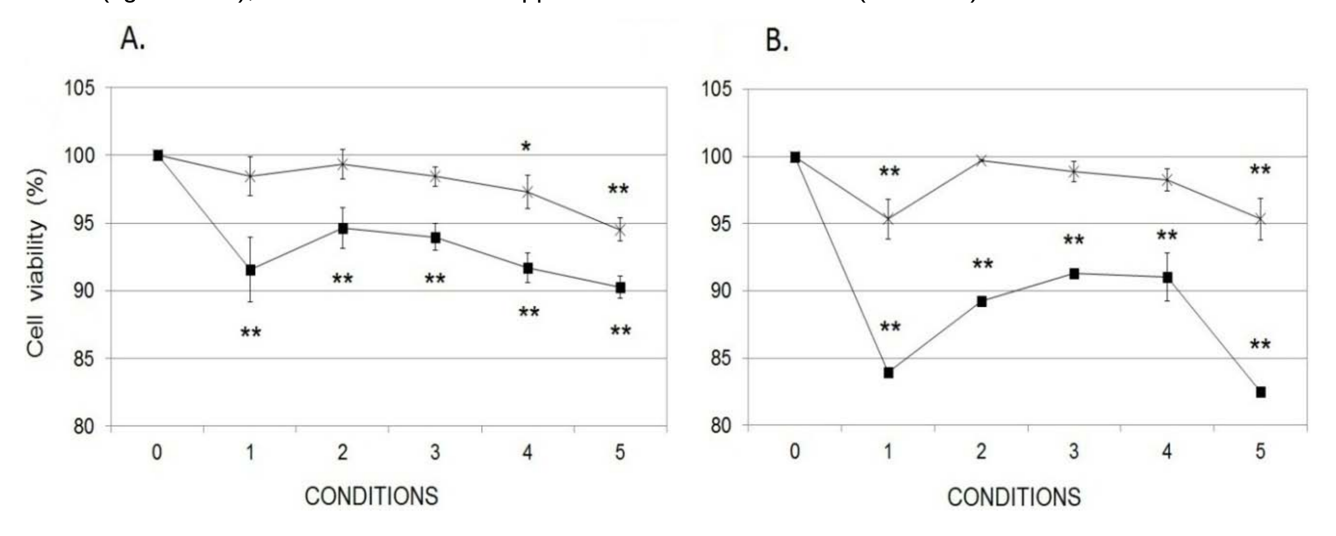


Figure 32 : Taux de survie des cellules hépatiques humaine HepG2 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes concentrations de mélange de ciprofloxacine + tamoxifène (■) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (X). Les résultats sont exprimés en moyennes et les valeurs sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

Les cellules HepG2 ont ensuite été traitées avec différents mélanges de molécules. Quel que soit le temps d'exposition des cellules hépatiques, la courbe dose-réponse est non monotone (figure 32). Les doses les plus faibles (conditions 1) et les plus fortes (conditions 5) de CIP + TAM entrainent une inhibition de la croissance plus importante. Ce phénomène s'amplifie avec le temps d'exposition. La même tendance est observée à 72 h lorsque que les cellules sont exposées simultanément aux trois molécules.

Cependant, l'addition de cyclophosphamide au mélange CIP + TAM conduit à un effet antagoniste et atténue considérablement la toxicité. Seules les doses des conditions 4 et 5 inhibent légèrement la croissance à 24 h (p<0,05 ; p<0,01), ainsi que celles des conditions 1 et 5 à 72 h (p<0,01). Bien que les valeurs mesurées soient significatives, le taux d'inhibition ne dépasse pas les 5 %.

Afin de comparer les différentes interactions des mélanges binaires (CIP +TAM) et ternaires (CIP + TAM + CP), les effets observés ont été comparés avec les effets attendus, de la même manière que pour le test de croissance sur *Lemna minor* (*cf*. § I.3). Les valeurs attendues de toxicité ont été

calculées à partir de la toxicité respective des molécules (tableau 10). Les 2 modèles de référence d'addition des concentrations (CA) et de l'action indépendante (IA) ont été utilisés pour tirer les modèles des effets conjugués en mélange (figure 33).

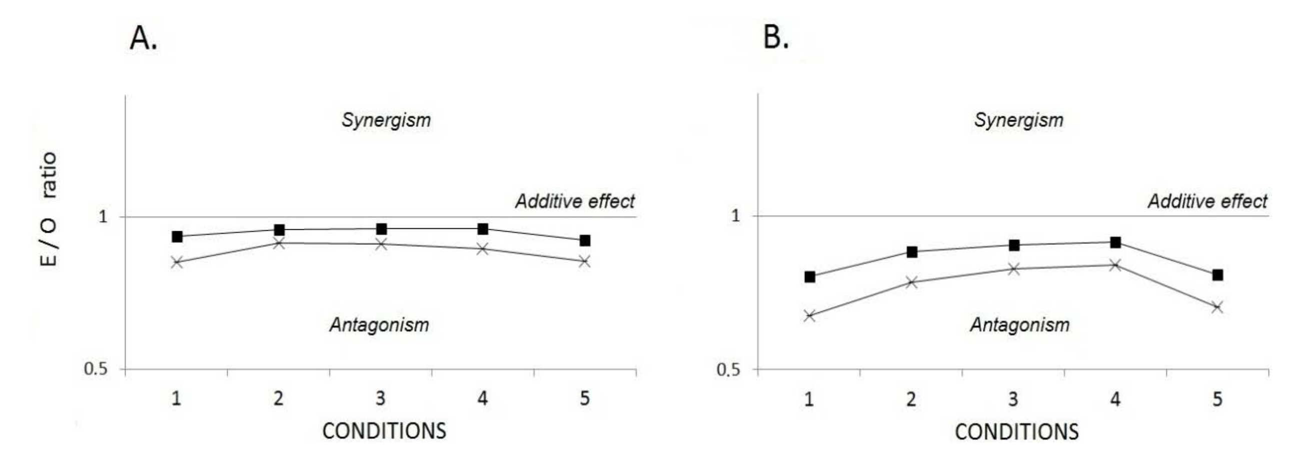


Figure 33 : Comparaison des ratios [valeur attendue (E) / valeur observée (O)] calculés pour les cellules hépatiques humaine HepG2 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes concentrations de mélange de ciprofloxacine + tamoxifène (■) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (X).

A.

Mélanges de molécule	Condition				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
CIP + TAM att.	85.71	90.88	90.35	88.34	83.43
CIP + TAMobs.	91.52 ± 2.39	94.64 ± 1.51	93.97 ± 0.96	91.67 ± 1.09	90.23 ± 0.80
E/O	0.94	0.96	0.96	0.96	0.92
CTC att.	84.04	90.91	89.84	87.14	80.94
CTCobs.	98.57 ± 1.42	99.34 ± 1.10	98.44 ± 0.73	97.28 ± 1.21	94.52 ± 0.87
E/O	0.85	0.92	0.91	0.90	0.86

B.

Mélanges de molécules	Condition				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
CIP + TAMatt.	67.34	78.92	82.51	83.19	69.24
CIP + TAMobs.	83.93 ± 0.11	89.22 ± 0.15	91.29 ± 0.38	91.03 ± 1.77	82.51 ± 0.18
E/O	0.80	0.88	0.90	0.91	0.84
CTC att.	64.12	78.26	81.72	82.38	66.91
CTCobs.	95.33 ± 1.46	99.72 ± 0.07	98.87 ± 0.78	98.24 ± 0.82	95.36 ± 1.54
E/O	0.67	0.78	0.83	0.84	0.70

Tableau 10 : Comparaison entre les valeurs additives attendues et les résultats obtenus en % de cellules hépatiques HepG2 exposées pendant 24 h (A) et 72 h (B) à des mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP + TAM) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC). E/O représente le ratio entre valeur attendue (E) et valeur observe (O).

Quelles que soient les concentrations relatives, le type de mélange (binaire ou ternaire) testé et le temps d'exposition des cellules hépatiques HepG2, on constate que les ratios E/O observés sont toujours strictement inférieurs à 1. Ces résultats indiquent qu'un effet antagoniste intervient lorsque les molécules étudiées sont présentes simultanément, même aux plus faibles doses testées. De plus, l'antagonisme est plus prononcé en présence de cyclophosphamide comparé aux mélanges CIP + TAM.

I.4.1.b. Etude de la toxicité des mélanges CIP + TAM en doses croissantes inverses

Nous avons vu précédemment qu'en mélange de très faible quantité de médicaments étaient capables d'entrainer une toxicité, alors que souvent seuls ils ne modulaient pas la viabilité cellulaire. Dans le chapitre I.4.1.a, nous avons étudié l'interaction des mélanges constituées de doses croissantes de molécules.

Comme deux produits entrainent des phénomènes d'hormèse, nous nous sommes demandé si seul le rapport de concentration entre les produits était important ou si de faible concentration de l'un pouvait influer sur de forte concentration de l'autre. Pour cela nous avons déterminé l'impact de mélange de CIP + TAM en dose inverse de gammes de concentrations (doses croissantes de CIP associées à des doses décroissantes de TAM) sur la viabilité cellulaire à 24 h (toxicité aiguë) et 72 h (toxicité chronique). Les résultats sont présentés dans la figure 34 et sont exprimés en valeurs médianes de 15 mesures (triplicata de 5 points de mesure).

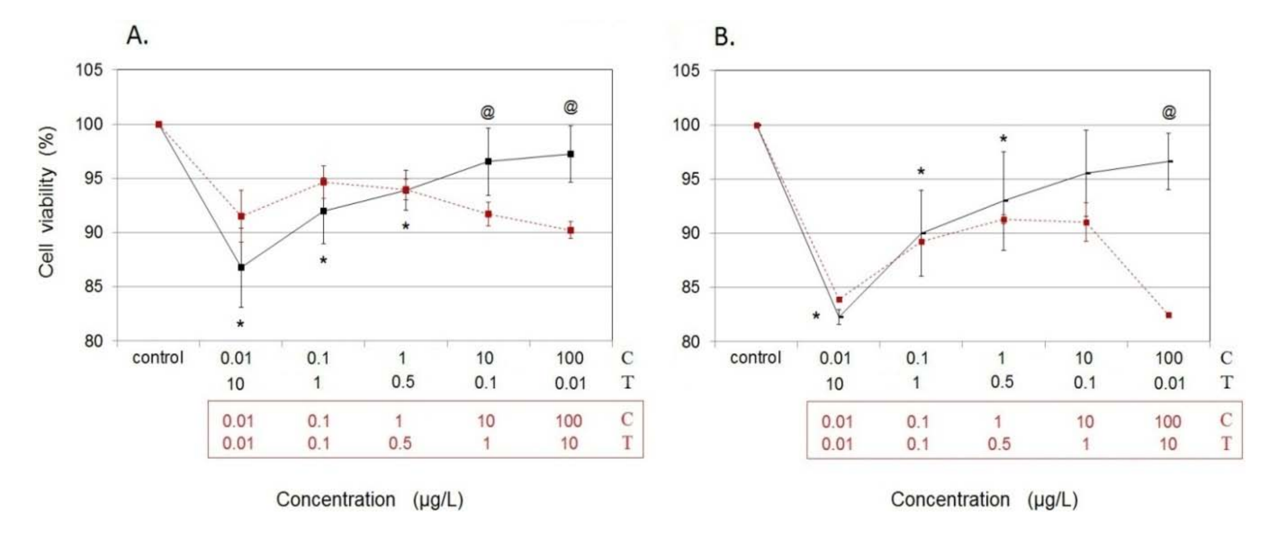


Figure 34 : Taux de survie des cellules hépatiques humaine HepG2 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes concentrations de mélange en doses inverses de ciprofloxacine + tamoxifène (courbe noire). Les résultats sont exprimés en moyennes et comparés avec ceux des mélanges en doses croissantes (courbe rouge). Les valeurs sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) ; @ différence significative (P<0,05) entre les mélanges.

Quel que soit le temps d'exposition des cellules hépatiques, on observe une courbe en U, avec une inhibitionde la viabilité cellulaire dose-dépendante du TAM. De faibles doses de CIP (0,01 ; 0,1 ; 1 µg/L) mélangées à de fortes doses de TAM (0,5 ; 1 ; 10 µg/L) induisent des réponses de toxicité significatives (p<0,05).

Si on compare l'exposition des cellules pendant 72 h à CIP 100 µg/L + TAM 0,01 µg/L et à CIP 100 µg/L + TAM 10µg/L, on constate que le taux d'inhibition est significativement plus important lors de l'exposition à la plus forte concentration de TAM pour une quantité fixe de CIP (figure 34.B). De même lorsque 10 µg/L de TAM est associé soit à 0,01 µg/L ou 100 µg/L de CIP, on constate que le taux d'inhibition est le même (environ 82 % de survie). Néanmoins, l'effet n'est pas exclusivement du au TAM puisque si on compare les conditions dans lesquelles les cellules ont été exposées au plus faibles doses de CIP (0,01 µg/l) avec soit 0,01 µg/l de TAM ou 10 µg/l de TAM, bien que la concentration en TAM soit 10.000 fois supérieure, l'inhibition de la viabilité est la même. Le phénomène est le même pour des expositions des cellules à 0,1 µg/L de CIP + soit 0,1 µg/L de TAM ou 1 µg/L de TAM. L'inhibition est identique bien que la quantité de TAM soit 100 fois plus importante.

Les effets observés ici ont ensuite été comparés avec les effets attendus, comme précédemment (*cf.* § I.4.1.a). Les valeurs attendues de toxicité ont été calculées à partir de la toxicité respective des molécules mesurée (tableau 11). Les 2 modèles de référence d'addition des concentrations (CA) et de l'action indépendante (IA) ont été utilisés pour tirer les modèles des effets conjugués en mélange (figure 35).

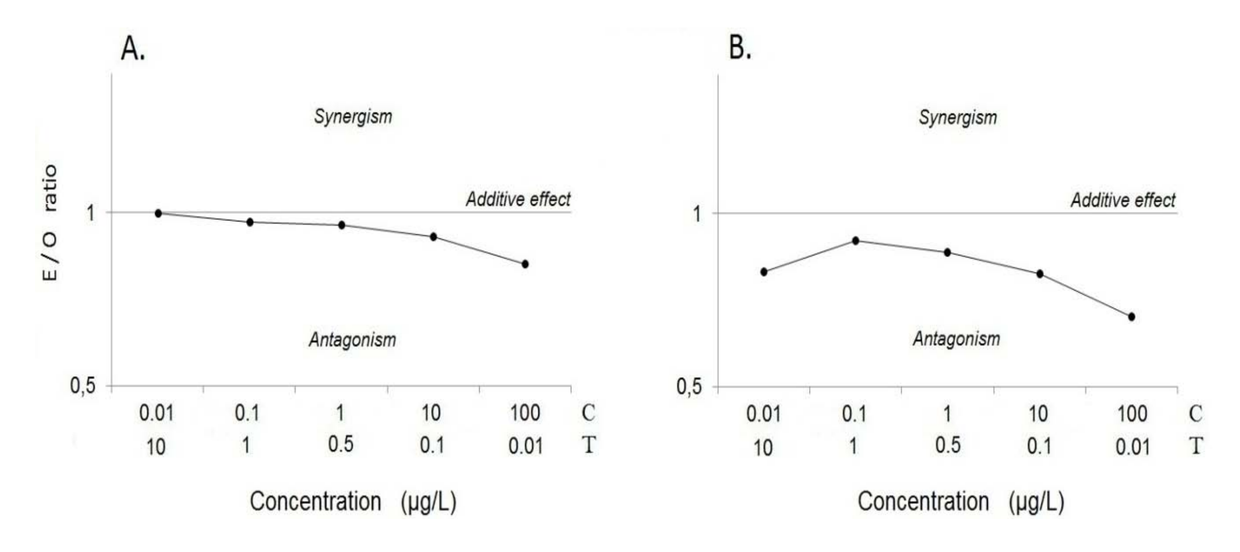


Figure 35 : Comparaison des ratios [valeur attendue (E) / valeur observée (O)] calculés pour les cellules hépatiques humaine HepG2 exposées 24 h (A) et 72 h (B) aux mélanges CIP + TAM en dose inverses.

A.

Mélanges de molécule	0,01	0,1	1	10	100	CIP
	10	**1**	**0,5**	**0,1**	**0,01**	TAM
CIP + TAM att.	86.42	89.33	90.35	89.88	82.74	
CIP + TAMobs.	86.75 ± 3.68	92 ± 3.04	93.87 ± 1.85	96.52 ± 3.08	97.24 ± 2.61	
E/O	1.00	0.97	0.96	0.93	0.85	

B.

Mélanges de molécule	**0,01**	**0,1**	**1**	**10**	**100**	CIP
	10	**1**	**0,5**	**0,1**	**0,01**	TAM
CIP + TAM $_{att.}$	68.59	83.04	82.51	79.06	67.98	
CIP + TAM$_{obs.}$	82.29 ± 0.70	89.99 ± 3.97	92.97 ± 4.52	95.56 ± 3.97	96.65 ± 2.60	
E/O	0.83	0.92	0.89	0.83	0.70	

Tableau 11 : Comparaison entre les valeurs additives attendues et les résultats obtenus en % de cellules hépatiques HepG2 exposées pendant 24 h (A) et 72 h (B) aux mélanges CIP + TAM en dose inverse. E/O représente le ratio entre valeur attendue (E) et valeur observe (O).

Mis à part les effets induits après 24 h d'exposition dans la condition 1 du mélange binaire CIP + TAM, on peut observer que les tendances des courbes à 24 h et 72 h sont comparables avec celles obtenus pour le mélange en doses croissantes. Ainsi, toutes les conditions CIP + TAM en doses inverses entrainent des effets antagonistes (E/O < 1). En effet, lorsque l'on compare les valeurs du tableau 10, on constate à 24 h que seules les conditions 4 et 5 induisent une toxicité significativement moins importante que celle attendue, tandis qu'à 72 h cette observation est valable pour toutes les conditions. Ces résultats semblent indiquer que ce n'est pas le TAM qui joue le rôle prépondérant dans la réponse de toxicité lorsqu'il est additionné à la CIP.

I.4.2. Evaluation de la viabilité des cellules mammaires MCF-7

I.4.2.a. Toxicité respective et en mélange de la ciprofloxacine, du tamoxifène et du cyclophosphamide en doses croissantes

La viabilité des cellules MCF-7 exposées pendant 24 h et 72 h à de faibles doses (non thérapeutiques) de ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide seuls ou en mélange sont respectivement présentés dans les figures 36 et 37. Les résultats sont exprimés en valeurs médianes de 15 mesures (triplicata de 5 points de mesure).

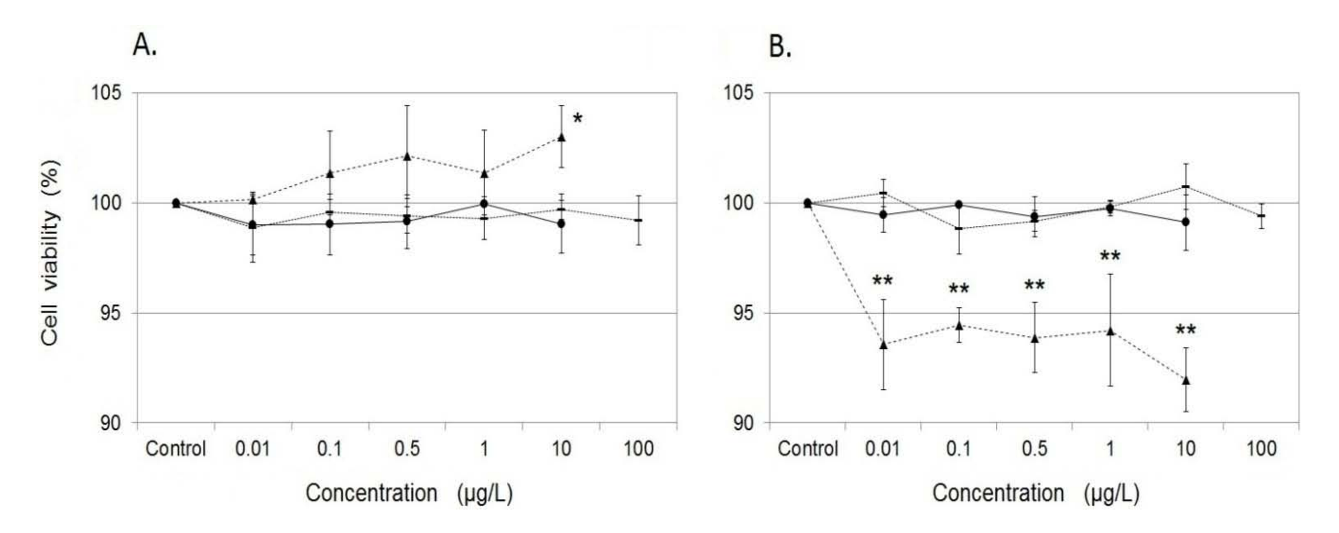


Figure 36 : Taux de survie des cellules mammaires humaine MCF-7 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à des concentrations croissantes de ciprofloxacine (-), tamoxifène (●) et cyclophosphamide (▲). Les résultats sont exprimés en médianes et les valeurs sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

Quel que soit le temps d'exposition des cellules mammaires MCF-7, les faibles doses de tamoxifène n'induisent pas d'inhibition de la croissance cellulaire.

Pour ce qui est du cyclophosphamide, on constate à 24 h l'apparition d'une prolifération cellulaire (p<0,05) pour la plus forte dose testée (10 µg/L). La même gamme de concentrations de cyclophosphamide entraine une inhibition significative de la croissance à 72 h, de l'ordre de 5 % (p<0,01). La toxicité la plus importante est induite par la plus forte dose (10 µg/L) et atteint 7 % d'inhibition. La comparaison à 24 h et 72 h de la viabilité des cellules exposées à 100 µg/L de cyclophosphamide montre une réponse inversée, avec dans un premier temps une stimulation de la croissance puis une cytotoxicité. Ceci pourrait s'expliquer par un phénomène d'adaptation cellulaire avec la mise en œuvre des enzymes impliquée dans l'apoptose. Chow & Loo (2003) ont mis en évidence la modulation de l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques (familles de protéines bcl-2 et p53) des cellules MCF-7 exposées à de fortes doses de cyclophosphamide, ce qui pourrait expliquer la toxicité observé ici.

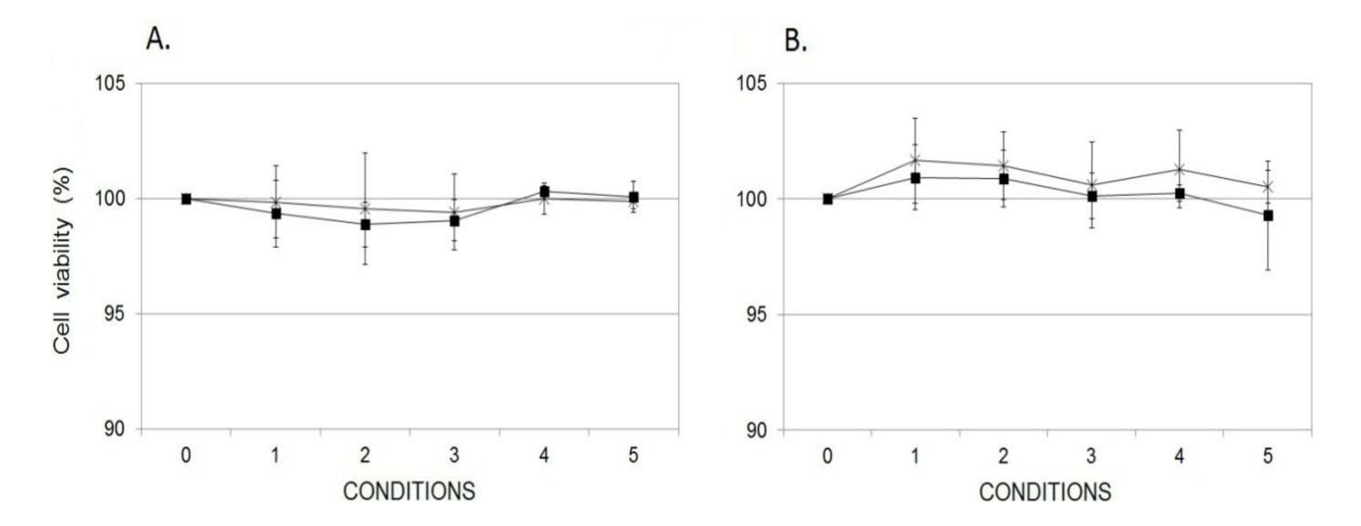


Figure 37 : Taux de survie des cellules mammaires humaine MCF-7 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes concentrations de mélange de ciprofloxacine + tamoxifène (■) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (X). Les résultats sont exprimés en médianes et les valeurs sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

Les cellules ont ensuite été exposées aux différents mélanges. Quel que soit le temps d'exposition des cellules ou les doses des mélanges, aucune réponse de toxicité n'est observée dans la gamme des concentrations testées (figure 37).

Tout comme cela a été fait pour les cellules hépatiques HepG2, les interactions entre les molécules (mélanges binaires ou ternaires) ont été calculées à partir de la toxicité respective de chaque molécule sur les cellules mammaires MCF-7. Les modèles de référence d'addition des concentrations (CA) et de l'action indépendante (IA) ont été utilisés pour tirer les modèles des effets conjugués en mélange (figure 38). Les valeurs des effets observés comparés aux effets attendus sont présentées dans le tableau 12.

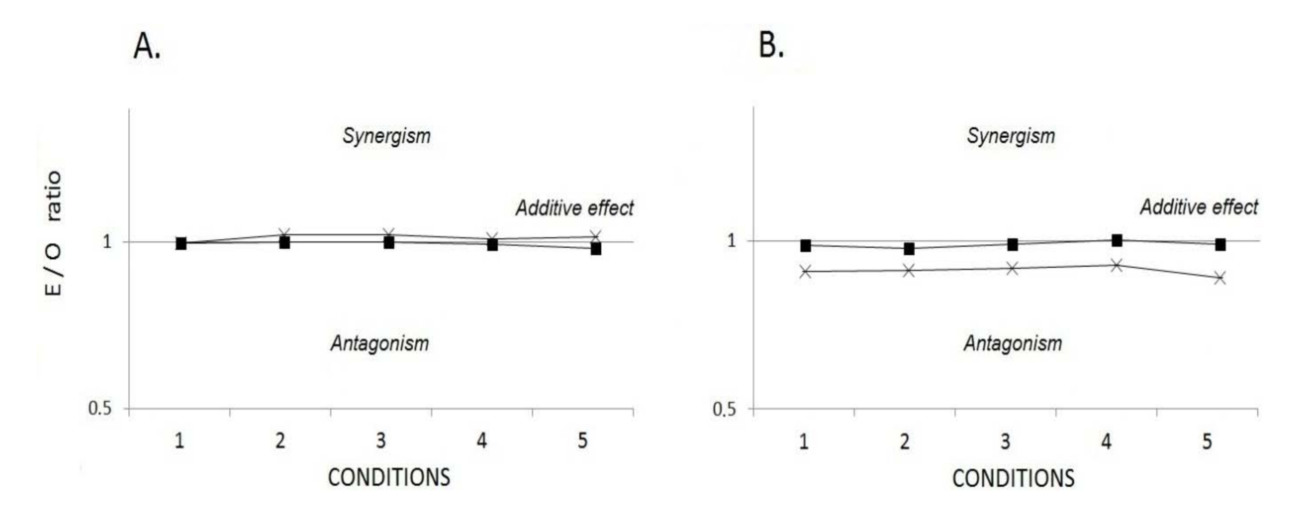


Figure 38 : Comparaison des ratios [valeur attendue (E) / valeur observée (O)] calculés pour les cellules mammaires humaine MCF-7 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes concentrations de mélange de ciprofloxacine + tamoxifène (■) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (X).

A.

Mélanges de molécule	Condition				
	1	2	3	4	5
CIP + TAM att.	97.90	98.62	95.45	99.61	98.27
CIP + TAMobs.	99.35 ± 1.44	98.88 ± 0.97	99.06 ± 0.89	100.31 ± 0.24	100.08 ± 0.67
E/O	**0.99**	**1.00**	**0.99**	**0.99**	**0.98**
CTC att.	98.03	99.95	100.55	100.97	101.22
CTC obs.	99.87 ± 1.56	99.56 ± 2.41	99.43 ± 1.66	100.02± 0.67	99.90 ± 0.33
E/O	**0.98**	**1.00**	**1.01**	**1.01**	**1.01**

B.

Mélanges de molécules	Condition				
	1	2	3	4	5
CIP + TAM att.	99.89	98.76	99.17	100.48	98.50
CIP + TAMobs.	100.93 ± 1.42	100.88 ± 1.22	100.14 ± 0.98	100.26 ± 0.37	99.29 ± 2.34
E/O	**0.99**	**0.98**	**0.99**	**1.00**	**0.99**
CTC att.	93.45	93.28	93.10	94.67	90.60
CTC obs.	102.16 ± 1.14	101.43 ± 1.45	100.62 ± 1.86	101.29± 1.69	100.53 ± 0.72
E/O	**0.92**	**0.92**	**0.93**	**0.93**	**0.90**

Tableau 12 : Comparaison entre les valeurs additives attendues et les résultats obtenus en % de cellules mammaires MCF-7 exposées pendant 24 h (A) et 72 h (B) à des mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP + TAM) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC). E/O représente le ratio entre valeur attendue (E) et valeur observe (O).

Contrairement à ce qui avait pu être observé dans la partie précédente avec les cellules HepG2, aucun effet antagoniste n'est observé après exposition 24 h et 72 h des cellules mammaires MCF-7 aux mélanges binaires CIP + TAM. De la même manière que pour les mélanges binaires, on ne constate aucune interaction lorsque les cellules sont exposées pendant 24 h aux mélanges CIP + TAM + CP. Par contre, après 72 h d'exposition aux mélanges ternaires, on observe un phénomène d'antagonisme. En effet, alors que toutes les doses de cyclophosphamide seul entrainaient une légère inhibition significative de la croissance cellulaire (figure 36), l'exposition à des mélanges ternaires n'entrainent plus aucune réponse de toxicité (figure 37).

I.4.2.b. Etude de la toxicité des mélanges CIP + TAM en doses inverses

Comme dans le chapitre I.4.1.b, nous avons également évalué l'impact des mélanges de CIP + TAM en dose inverse sur la viabilité cellulaire mammaire MCF-7. Les résultats sont présentés dans la figure 39 et sont exprimés en valeurs médianes de 15 mesures (triplicata de 5 points de mesure).

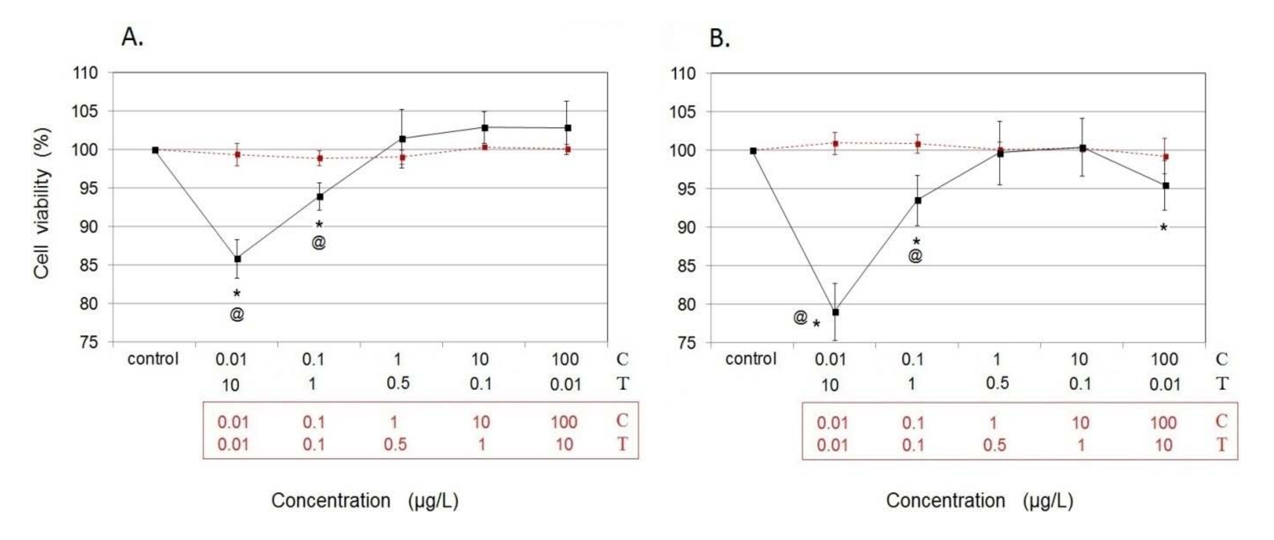


Figure 39 : Taux de survie des cellules mammaires humaine MCF-7 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes concentrations de mélange en doses inverses de ciprofloxacine + tamoxifène (courbe noire). Les résultats sont exprimés en médianes et comparés avec ceux des mélanges en doses croissantes (courbe rouge). Les valeurs sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) ; @ différence significative (P<0,01) entre les mélanges.

Contrairement à ce qui a pu être mis en évidence précédemment lors de l'analyse de doses croissantes en mélange, on constate ici l'apparition d'un effet de coalition des molécules. En effet, on observe à 24 h que les faibles doses de CIP (0,01 ; 0,1 µg/L) additionnés aux fortes doses de TAM (1 ; 10 µg/L) induisent une réponse de toxicité importante. Ce phénomène s'amplifie à 72 h.

On constate clairement que le phénomène n'est pas exclusivement lié à la seule concentration de TAM puisque pour une quantité équivalente de TAM (10 µg/l), l'inhibition est significative et nettement plus importante lorsque les cellules sont exposées simultanément aux plus faibles doses de CIP (0,01 µg/l), alors qu'il n'y a aucun effet de cette même dose de TAM lorsque l'exposition est combinée à une concentration 10.000 fois supérieure de CIP (100 µg/l).

Chapitre 2 : Etude du potentiel perturbateur endocrinien et de la génotoxicité de la ciprofloxacine, du tamoxifène et du cyclophosphamide

Dans le chapitre précédent nous avons montré que la viabilité cellulaire était affectée par des doses non-thérapeutiques de médicaments utilisés dans le traitement des cancers. Suivant les médicaments ou leur présence simultanée nous avons observé soit un phénomène de prolifération, soit une stimulation de la mort cellulaire. Ces deux évènements peuvent être la conséquence d'une altération du matériel génétique.

En effet, la mort cellulaire peut survenir soit par des phénomènes de nécrose, soit des phénomènes d'apoptose. Ce deuxième mode de mort cellulaire appelée mort-programmée, fait intervenir des enzymes spécifiques qui sont inductibles. L'apoptose est souvent le stade ultime d'une mauvaise réparation de dommages à l'ADN. Lors d'agression d'une cellule par un agent génotoxique, le gène suppresseur de tumeur p53 stoppe la réplication pour donner un temps à la cellule pour réparer ces dommages. Si la réparation n'est pas correcte, la cellule part en apoptose. La prolifération est une caractéristique des cellules cancéreuses qui perdent le contrôle du cycle cellulaire. Cette prolifération est souvent associée à la présence d'un p53 muté qui n'assure plus sa fonction (*cf*. figure 6). Ceci perturbe également l'expression de nombreux récepteurs et peut expliquer les phénomènes de perturbations endocriniennes.

Pour vérifier si ces médicaments aux doses environnementales pouvaient avoir un effet perturbateur endocrinien et/ou génotoxique nous avons analysé trois types d'effets : (i) perturbation endocrinienne (tests YES/YAS) ; (ii) la formation de cassures de l'ADN en utilisant le test des comètes ; (iii) la formation d'adduit « encombrant » en utilisant la méthode du post-marquage au ^{32}P.

Depuis le début des années 1980, l'étude de la génotoxicité en milieu aquatique s'est développée suite à l'observation de cancers dans des populations d'espèces marines ou d'eau douce (Black & Baumann 1991 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*., 1993 ; Burgeot *et al*., 1996 ; Akcha *et al*., 2003) ainsi que des perturbations endocriniennes (féminisation des poissons) (Manickum & John, 2014), en relation avec la persistance (voire la bioaccumulation) de composés chimiques ayant des propriétés mutagènes et cancérogènes.

La contamination des milieux aquatiques, par des polluants même à très faibles concentrations, peut modifier le métabolisme de l'individu et altérer l'intégrité du génome de deux manières différentes : (i) impact direct du polluant avec la molécule d'ADN ; (ii) un impact indirect lié à un stress oxydatif ou à une altération des protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN.

La mesure des adduits à l'ADN signe un effet génotoxique direct. La mesure des cassures de l'ADN est le reflet soit d'un effet du stress oxydatif, soit du phénomène de réparation des adduits.

II.1. Evaluation du potentiel perturbateur endocrinien sur les récepteurs œstrogéniques hERα et androgéniques hAR humains (test YES/YAS)

Les phénomènes de perturbations endocriniennes sont dépendantes des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes. L'activité œstrogénique est mesurée par le test YES et l'activité androgénique par le test YAS. Pour chacun des récepteurs, l'activité agoniste (interaction directe avec le récepteur) et l'activité antagoniste (modification de l'activité du récepteur) ont été testées. Les récepteurs humains ont été clonés dans une levure (*Saccharomyces Cerevisiae*).

Les levures ont été exposées pendant 18 h à différentes dilution d'une solution mère à 1 g/L de ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide seul ou en mélange. Les valeurs sont exprimées en moyenne de 4 points de mesure (2 séries en duplicata). Ces valeurs sont comparées à celle obtenues avec les substrats respectifs des récepteurs : (i) 17β œstradiol (agoniste des récepteurs œstrogéniques) ; (ii) 4-OH-tamoxifène (antagoniste des récepteurs œstrogéniques) ; (iii) 5 α-dihydrotestostérone (agoniste des récepteurs androgèniques) ; (iv) flutamide (antagoniste des récepteurs androgèniques).

II.1.1. Potentiel agoniste/antagoniste sur les récepteurs œstrogéniques hERα (test YES)

Pour réaliser l'essai, les solutions mères de chaque médicament ont été diluées de manière semi-logarithmique. Les gammes de dilution vont de 1.10^{-2} (10 mg/L) à 1.10^{-9} (1 ng/L) pour chaque médicament. On constate que quelle que soit la concentration testée, ni la ciprofloxacine (CIP), ni le cyclophosphamide (CP) n'entrainent d'effet agoniste ou antagoniste sur les récepteurs hERα (figure 40).

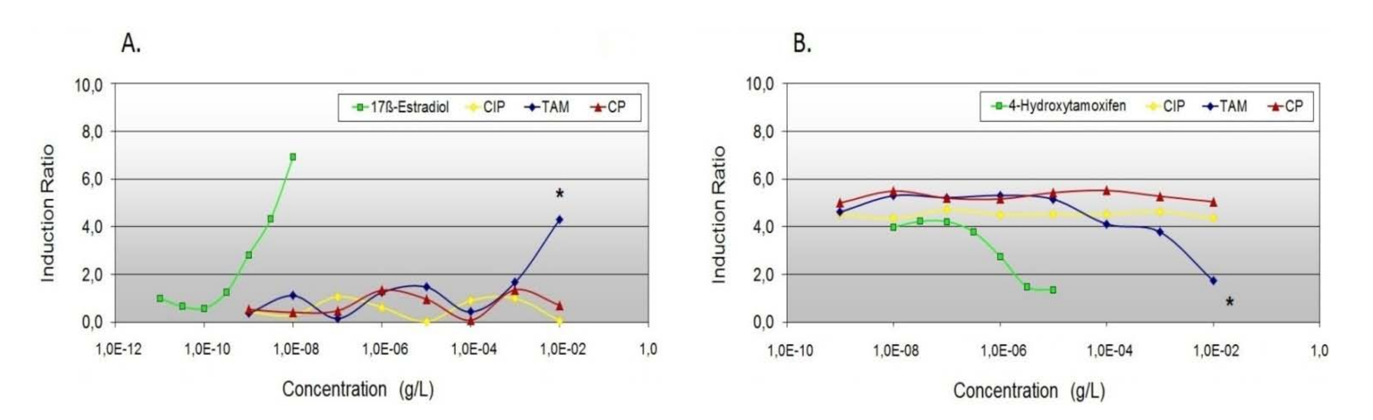


Figure 40 : Evaluation du potentiel agoniste (A) et antagoniste (B) sur les récepteurs œstrogéniques hERα (YES) après l'exposition de levures (*S. cerevisiae*) à différentes concentrations de ciprofloxacine (courbe jaune), tamoxifène (courbe bleue) et cyclophosphamide (courbe rouge). Les résultats sont considérés statistiquement significatives à p<0,05 (*).Les valeurs obtenues avec la condition contrôle (agoniste/antagoniste spécifique) est décrite par la courbe verte.

Par contre, l'exposition au tamoxifène à une dose de 10 mg/L (dilution 10^{-2}) entraine un effet agoniste significatif qui se traduit par un taux d'induction 4 fois supérieur ($p<0,05$) à l'activité basale des récepteurs. L'exposition à cette même dose de tamoxifène entraine également un effet antagoniste,

révélé par une activité des récepteurs réduite de moitié ($p<0,05$). Pour des expositions à des doses plus faibles de tamoxifène, il n'y a ni effet agoniste ni antagoniste. Par comparaison avec le témoin positif 4-hydroxytamoxifène qui induit des effets antagonistes à des doses de l'ordre du µg/L (10^{-6} à 10^{-4} g/L) (figure 40.B), la différence de sensibilité observée ici pourrait s'expliquer par une absence ou une lenteur de métabolisation de la molécule mère de tamoxifène par les levures. La molécule n'étant pas sous forme active, son affinité avec le récepteur en est affectée.

Lorsque les levures sont exposées aux mélanges binaires (CIP + TAM) ou ternaires (CTC) de molécules (figure 41), il n'y a pas d'effet agoniste significatif, même si une légère stimulation est observée lors de l'exposition au mélange des trois molécules à une dilution de 10^{-2} (10 mg/L de chaque molécule en mélange).

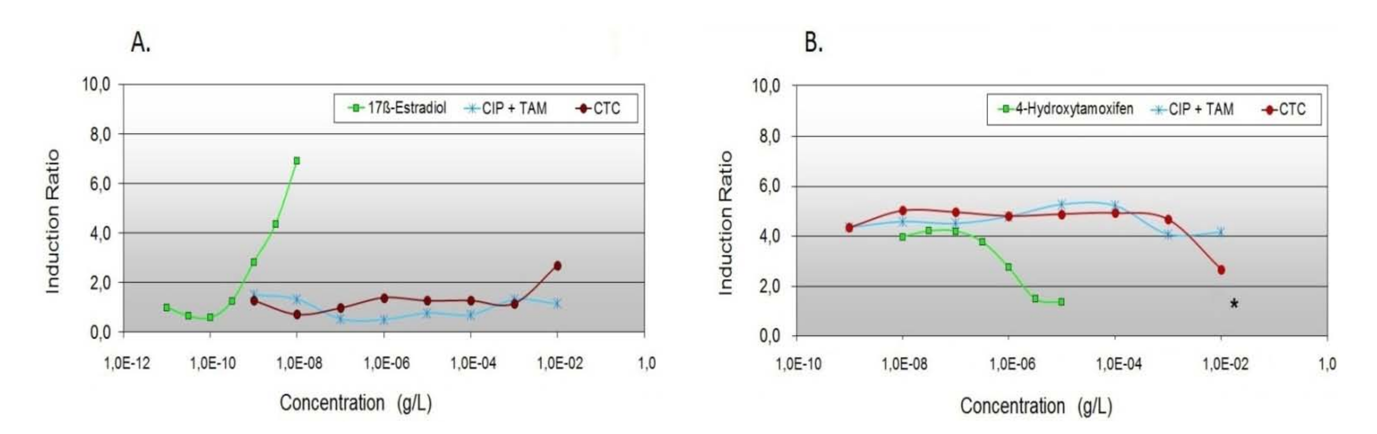


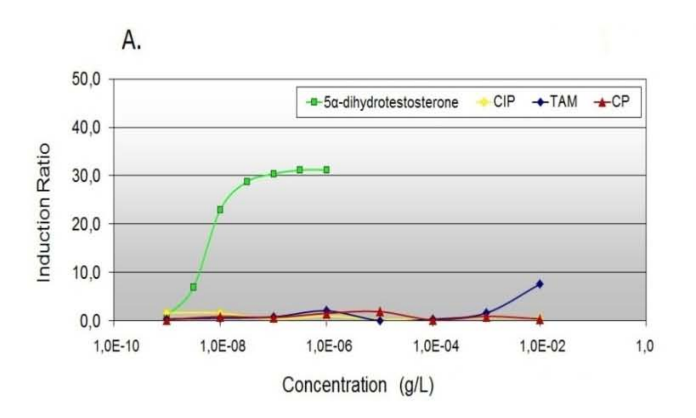
Figure 41 : Evaluation du potentiel agoniste (A) et antagoniste (B) sur les récepteurs œstrogéniques hERα (YES) après l'exposition de levures (*S. cerevisiae*) à des mélanges binaires CIP + TAM (courbe bleue) et ternaires CTC (courbe marron). Les résultats sont considérés statistiquement significatives à $p<0,05$ (*). Les valeurs obtenues avec la condition contrôle est décrite par la courbe verte.

Concernant le potentiel antagoniste des mélanges, on n'observe une inhibition de l'activité des récepteurs hERα que lorsque les levures sont exposées au mélange ternaire CTC dilué à 10^{-2} (10 mg/L de chaque molécule en mélange). L'activité antagoniste est 1,5 fois ($p<0,05$) moins importante que l'activité basale des récepteurs. Si on compare cette activité à celle mesurée lorsque les levures n'étaient exposées qu'au tamoxifène, on constate que pour le mélange ternaire elle est nettement moins élevée et que pour le mélange binaire il n'y a plus d'activité. La ciprofloxacine inhibe totalement l'effet antagoniste du tamoxifène.

II.1.2. Potentiel agoniste/antagoniste sur les récepteurs androgéniques hAR (test YAS)

L'effet des molécules seules sur le récepteur androgénique est présenté figure 42. On constate que quelle que soit la concentration testée, ni la ciprofloxacine (CIP) ni la cyclophosphamide (CP) n'entraine d'effet agoniste ou antagoniste sur les récepteur hAR.

Le tamoxifène n'a pas d'effet agoniste significatif vis-à-vis du récepteur aux androgènes (hAR) même si une tendance à l'induction est observée à la plus forte concentration. Par contre à cette dose de 10 mg/l (dilution 10^{-2}) on note un effet antagoniste significatif ($p<0,05$).



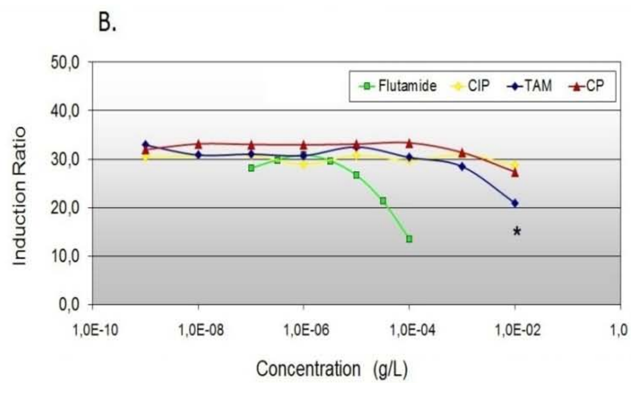
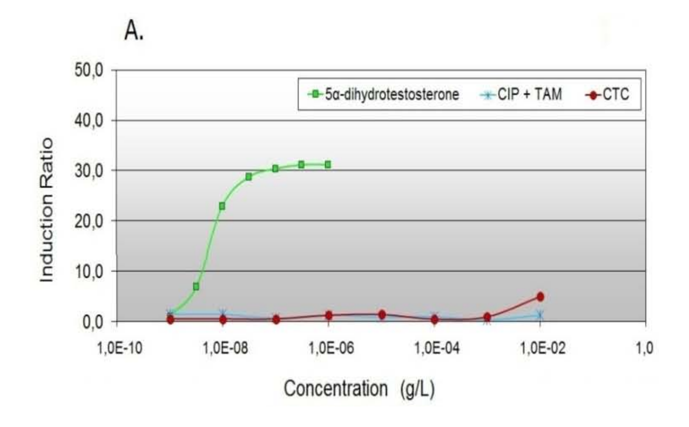


Figure 42 : Evaluation du potentiel agoniste (A) et antagoniste (B) sur les récepteurs androgéniques hAR (YAS) après l'exposition de levures (*S. cerevisiae*) à différentes concentrations de ciprofloxacine (courbe jaune), tamoxifène (courbe bleue) et cyclophosphamide (courbe rouge). Les résultats sont considérés statistiquement significatifs à p<0,05 (*). Les valeurs obtenues avec la condition contrôle est décrite par la courbe verte.

Lorsque les levures sont exposées à des dilutions de mélanges binaires (CIP + TAM) ou ternaires (CTC) de molécules (figure 43), on ne constate pas de modification de l'activité des récepteurs pour ce qui est du potentiel agoniste des médicaments. Bien que l'exposition aux mélanges des trois molécules à la dilution de 10^{-2} (10 mg/L de chaque molécule en mélange) semble entrainer un très léger effet agoniste, la valeur mesurée n'est pas significative. Elle est néanmoins moins élevée que celle mesurée lors de l'exposition des levures au tamoxifène seul.



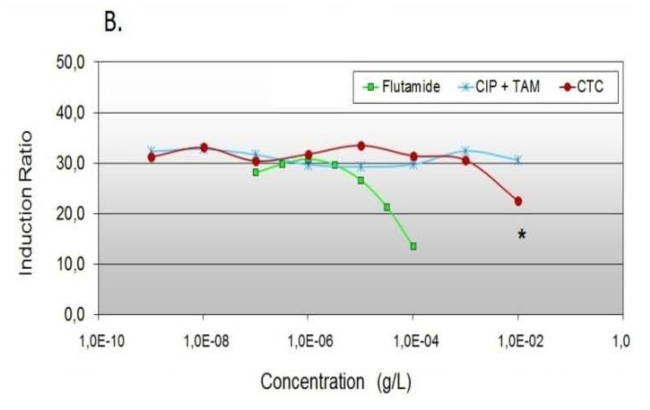


Figure 43 : Evaluation du potentiel agoniste (A) et antagoniste (B) sur les récepteurs androgéniques hAR (YAS) après l'exposition de levures (*S. cerevisiae*) à des mélanges binaires CIP + TAM (courbe bleue) et ternaires CTC (courbe marron). Les résultats sont considérés statistiquement significatives à p<0,05 (*). Les valeurs obtenues avec la condition contrôle est décrite par la courbe verte.

Concernant le potentiel antagoniste des mélanges, on note une inhibition de l'activité des récepteurs hAR seulement lorsque les levures sont exposées au mélange ternaire CTC dilué à 10^{-2} (10 mg/L de chaque molécule en mélange). Le taux d'induction diminue d'un tiers ($p<0,05$) comparé à l'activité basale des récepteurs. Aucune autre perturbation n'a été mesurée pour les autres concentrations de la gamme testée.

Il est important de noter que cet effet antagoniste est équivalent à celui observé lors de l'exposition au TAM seul. Par contre en mélange binaire (CIP + TAM), il n'y a pas du tout d'effet antagoniste, confirmant que la CIP empêche totalement l'effet androgène du TAM.

II.2. Analyse des cassures à l'ADN sur cellules humaines hépatiques (HepG2) et mammaires (MCF7) (test des comètes)

La présence de cassures à l'ADN induites par les molécules seules ou en mélange a été recherchée sur des lignées cellulaires humaines hépatiques (HepG2) et des glandes mammaires (MCF7) exposées 24, 48 h et 72 h aux médicaments afin de rendre compte des effets génotoxiques aigus (première génération de cellules) et chroniques ($n^{ième}$ génération de cellules). Pour des raisons de simplification, les résultats ci-après ne présentent que les effets observés à 24 h (effet aiguë) et 72 h (effet chronique).

II.2.1. Analyse des cassures à l'ADN induites sur cellules hépatiques (HepG2)

La formation de cassures à l'ADN ont été évaluée sur des cellules HepG2 exposées 24 h et 72 h à de faibles doses (non-thérapeutique) de ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide (figures 44 et 45). Les résultats sont exprimés en valeurs médianes de 8 mesures (4 séries indépendantes réalisées en duplicata).

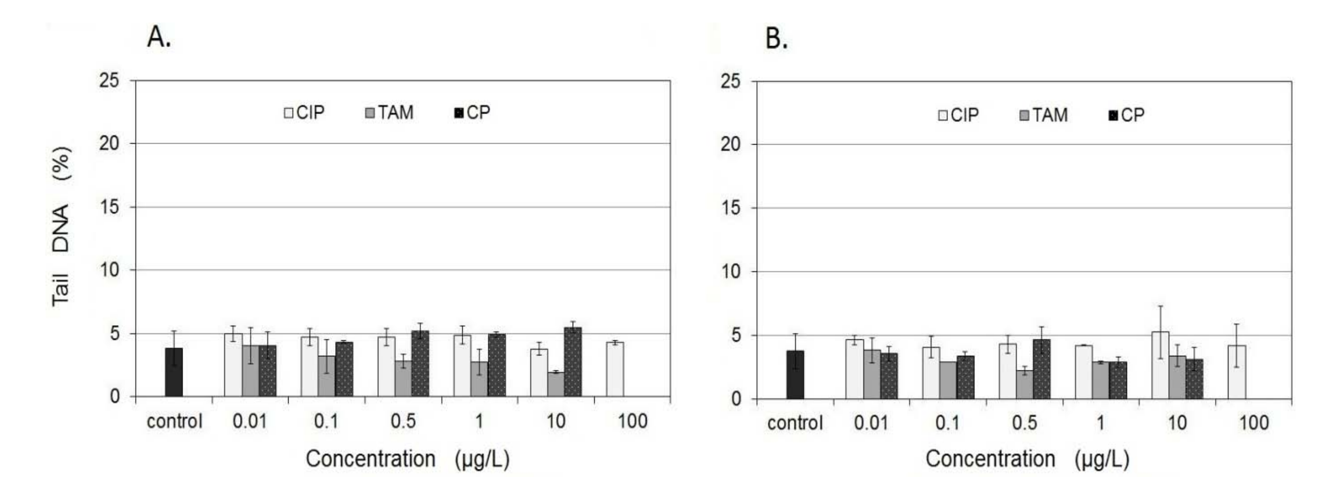


Figure 44 : Taux de cassures à l'ADN induites sur des cellules hépatiques humaine HepG2 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes concentrations de ciprofloxacine (CIP, blanc), tamoxifène (TAM, gris) et cyclophosphamide (CP, noir). Les résultats sont exprimés en médianes et les valeurs considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

Dans la gamme de concentrations testées (10 ng/L – 10 µg/L), l'exposition des cellules hépatiques à chaque molécule respective n'entraine pas de cassures à l'ADN quelque soit le temps d'exposition (figure 44). Même l'exposition à une dose 10 fois plus concentrée de ciprofloxacine (100 µg/L) n'induit pas de génotoxicité.

Lorsque les cellules sont exposées aux mélanges binaires ou ternaires, des cassures à l'ADN significatives (p<0,05 et p<0,01) apparaissent quelle que soit la condition testée et quel que soit le temps d'exposition (figure 45). Les cassures à l'ADN sont plus importantes après 24 h d'exposition qu'après 72 h, aussi bien pour l'exposition au mélange binaire (CIP + TAM) que ternaire (CTC). On constate un phénomène de potentialisation entre ciprofloxacine et tamoxifène, par contre les concentrations n'ont que peu d'influence.

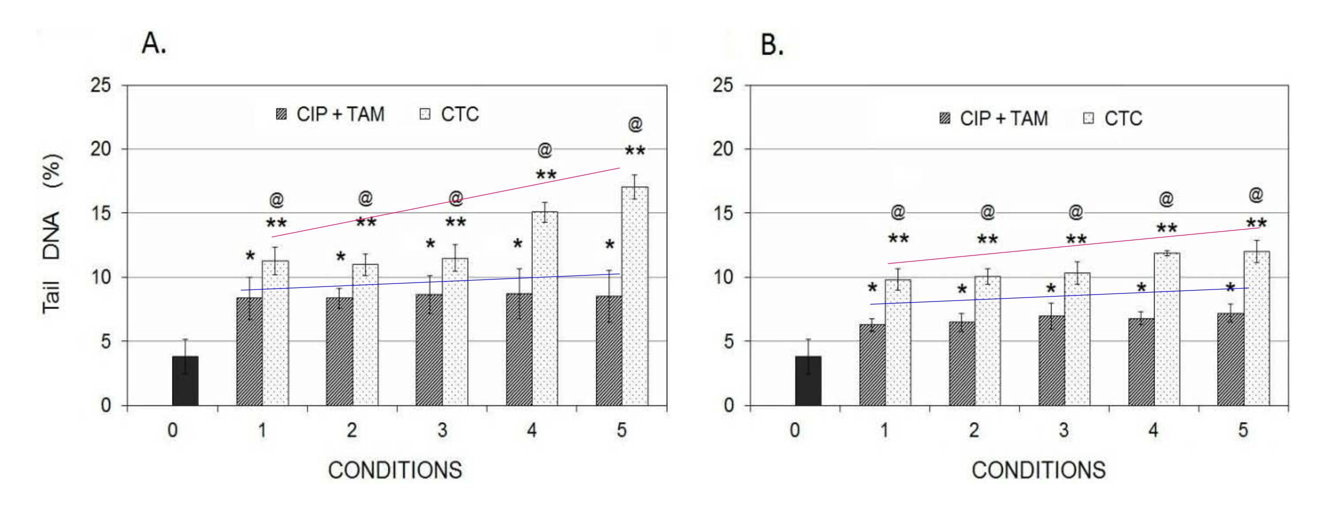


Figure 45 : Taux de cassures à l'ADN induites sur des cellules hépatiques humaine HepG2 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes mélanges de ciprofloxacine+ tamoxifène (CIP+TAM) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC). Les résultats sont exprimés en médianes et les valeurs considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

On constate également que la formation des cassures à l'ADN sont dose-dépendantes lorsque les cellules sont exposées aux trois molécules en mélange. Ces cassures sont significativement plus importantes (p<0,01) que celles induites par les mélanges de CIP + TAM. Bien que globalement le nombre de cassures à l'ADN diminue avec le temps d'exposition, après 72 h la génotoxicité restent significativement plus élevée avec l'exposition aux mélanges ternaires (CTC) par rapport aux mélanges binaires (p<0,01) (figure45.B). La cyclophosphamide a un rôle de potentialisation.

II.2.2. Analyse des cassures à l'ADN sur cellules mammaires (MCF-7)

La formation de cassures à l'ADN a aussi été évaluée sur les cellules MCF-7 exposées 24 h et 72 h à de faibles doses de ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide. Les résultats présentés dans les figures 46 et 47 sont exprimés en valeurs médianes de 8 mesures (4 séries indépendantes réalisées en duplicata).

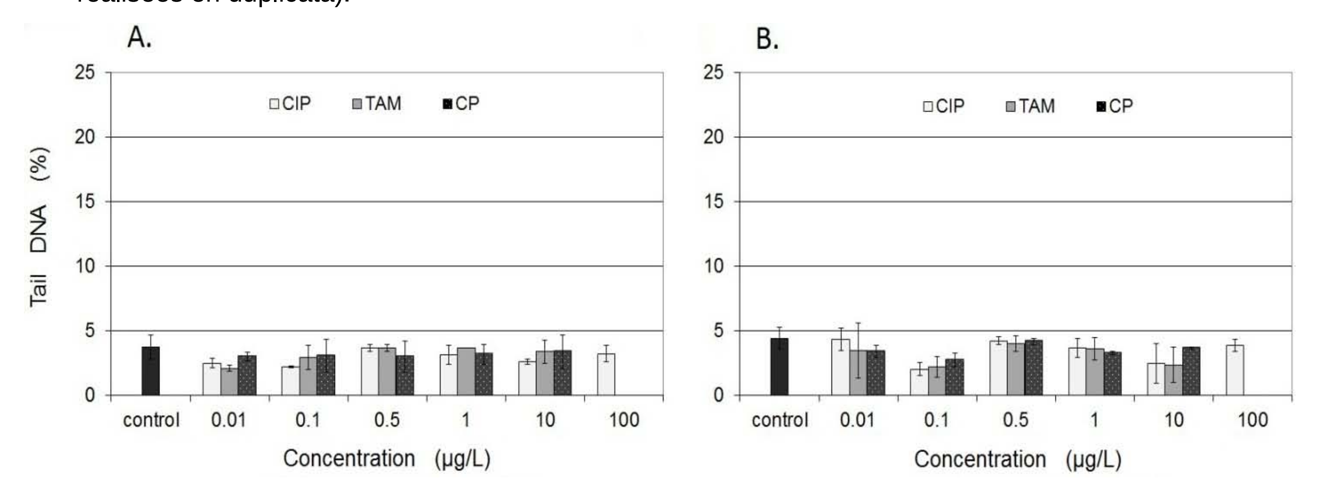


Figure 46 : Taux de cassures à l'ADN induites sur des cellules mammaires humaine MCF-7 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes concentrations de ciprofloxacine (CIP, blanc), tamoxifène (TAM, gris) et cyclophosphamide (CP, noir). Les résultats sont exprimés en médianes et les valeurs considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

Dans la gamme de concentrations testées (10 ng/L – 10 µg/L), l'exposition des cellules des glandes mammaires à chaque molécule n'entraine pas de cassures à l'ADN quel que soit le temps d'exposition (figure 46). Même l'exposition à une dose 10 fois plus concentrée de ciprofloxacine (100 µg/L) n'induit pas de cassures.

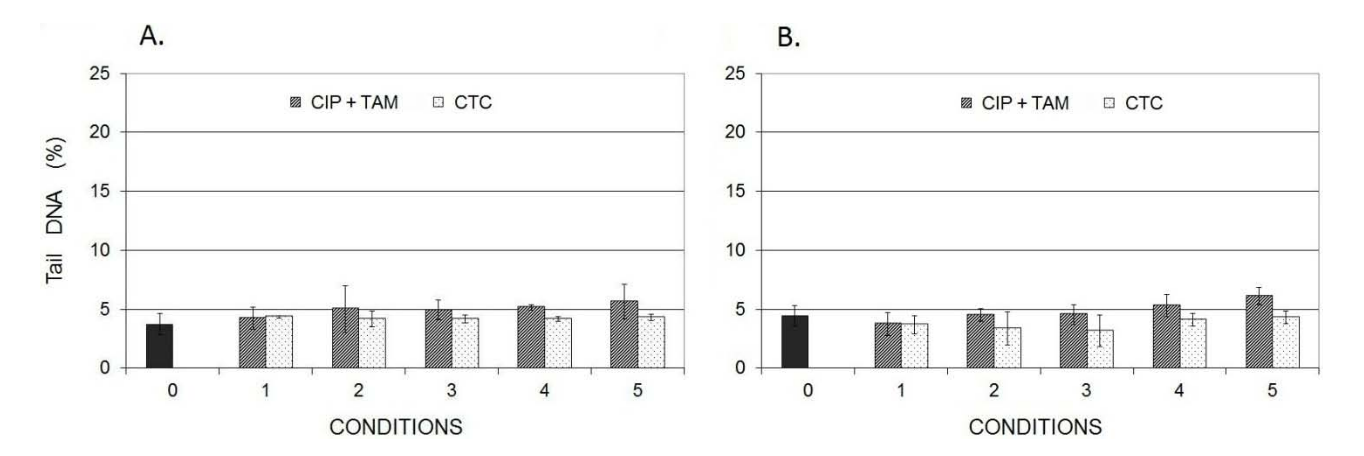


Figure 47 : Taux de cassures à l'ADN induites sur des cellules humaines de glandes mammaires MCF7 exposées 24 h (A) et 72 h (B) à différentes mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP + TAM, gris) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC, blanc). Les résultats sont exprimés en médianes et les valeurs considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

Concernant l'exposition des cellules mammaires MCF-7 aux différents types de mélanges (binaire ou ternaire), aucune cassure à l'ADN significativement différente de la condition contrôle de l'ADN n'a été observée et ce quel que soit le temps d'exposition (figure 47).

II.3. Analyse de la formation d'adduits à l'ADN sur cellules humaine hépatiques et mammaires (technique du post-marquage au ^{32}P)

Dans notre étude, nous avons évalué la génotoxicité par la mesure des adduits encombrants. Les résultats quantitatifs obtenus à partir de la technique de post-marquage au ^{32}P sont exprimés en valeurs moyennes de 4 points de mesures (deux séries réalisées en duplicata).

Compte tenu du grand nombre d'échantillons analysés lors des travaux de thèse et du fait de la manipulation de source radioactive au laboratoire, nous avons focalisé notre attention sur un nombre restreint de temps d'exposition. Une première approche a été faite avec l'exposition des deux lignées cellulaires HepG2 et MCF-7 pendant 7, 16 et 24 h à quelques concentrations de médicaments seuls ou mélanges. Quelle que soit la condition testée, aucun adduit n'a été observé après 7 h et 16 h d'exposition. Nous avons donc choisi de poursuivre nos analyses uniquement à 24 h d'exposition.

II.3.1. Analyse de la formation d'adduits à l'ADN sur cellules hépatiques (HepG2)

L'exposition des cellules hépatiques HepG2 à la ciprofloxacine et au cyclophosphamide n'induit pas de formation d'adduits à l'ADN, et ce quelle que soit la concentration. A l'inverse, le tamoxifène induit la formation d'adduits à l'ADN. Un exemple de profils types obtenus après l'exposition des cellules est présenté dans la figure 48. Suivant les conditions testées, un à trois adduits caractéristiques (numérotés #1-3) sont formés lorsque le tamoxifène est présent seul ou en mélange

(figure 48). L'exposition au tamoxifène seul (figure 48.B) entraine la formation de deux adduits individuels (#1 ; 2). Quelle que soit la concentration, ce composé entraine la formation significative d'adduits (p<0,01).

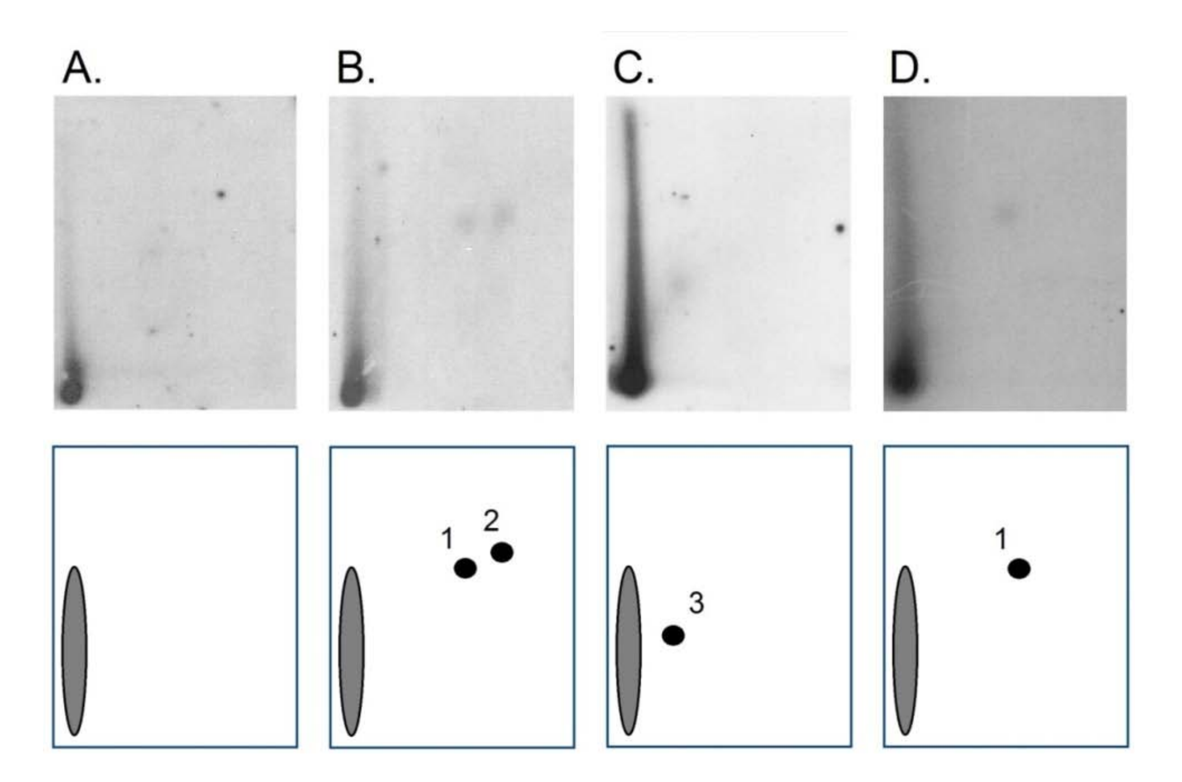


Figure 48 : Exemple de profils d'adduits à d'ADN de cellules hépatiques HepG2 exposés à différentes conditions pendant 24h: (A) contrôle ; (B) cellules exposées au TAM; (C) cellules exposées aux mélanges CIP + TAM ; (D) cellules exposées aux mélanges CTC.

De manière quantitative, on observe une génotoxicité dose-dépendante suite à l'exposition des cellules au tamoxifène seul (figure 49). L'exposition à 10 µg/L de tamoxifène induit trois fois plus d'adduits (p<0,01) comparé à la plus faible dose de la gamme de concentration (10 ng/L).

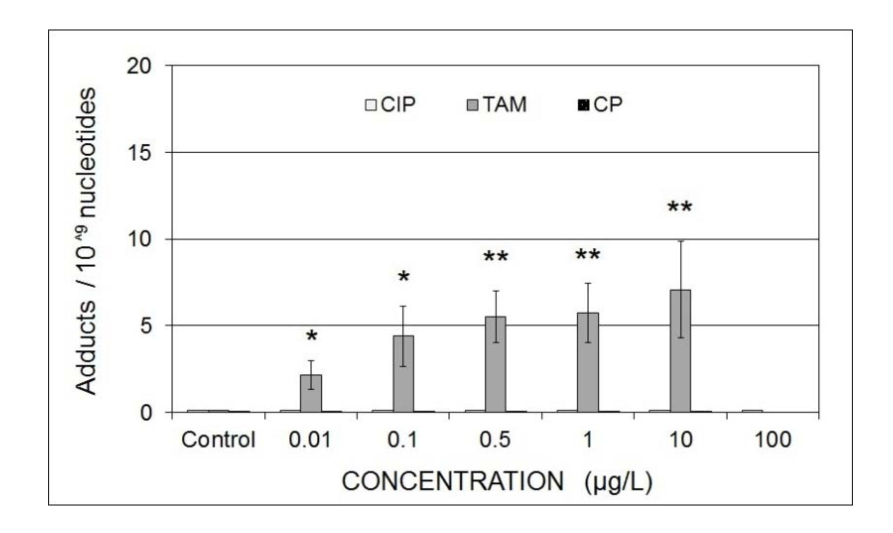


Figure 49 : Nombres d'adduits à l'ADN par 10^9 nucléotides formés dans les cellules hépatiques HepG2 exposées 24 h à différentes concentrations de ciprofloxacine (CIP), tamoxifène (TAM) et cyclophosphamide (CP). Les résultats sont exprimés en moyennes et les valeurs considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

Dans le cas d'exposition des cellules au mélange CIP + TAM, seulement un adduit individuel est observé (figure 48.C). Comme la nature de l'adduit est différente des deux précédents il a été numéroté #3. La courbe dose-réponse de formation des adduits lors de l'exposition des cellules hépatiques aux mélanges binaires est non-monotone (courbe en U inversé) (figure 50).

Après une formation importante d'adduit lors de l'exposition simultanée aux faibles concentrations de CIP et TAM, le nombre d'adduit à l'ADN diminue graduellement lorsque les doses augmentent. La nature des adduits formés étant différentes les expositions au TAM seul ou CIP + TAM, nous avons à faire un phénomène de potentialisation plus que de synergie. Ce phénomène est particulièrement marqué lorsque l'on compare les valeurs additives de toxicité attendues de la condition 1 et 2 avec celles observées (tableau 13). Le nombre d'adduits au total est respectivement multiplié par un facteur 4 et 1,5. Il est vraisemblable que l'adduit ne soit pas formé par le même métabolite que précédemment.

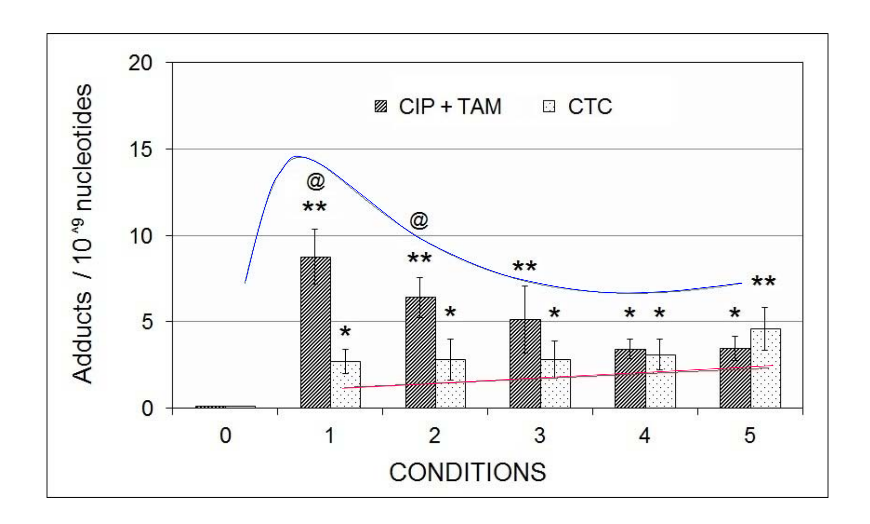


Figure 50 : Nombre d'adduits à l'ADN par 10^9 nucléotides formés dans les cellules hépatiques HepG2 exposées 24 h à différentes mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP + TAM, gris) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC, blanc). Les résultats sont exprimés en moyennes et les valeurs considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) ; différence significative à p<0,05 (@) entre les mélanges CIP+TAM et CTC.

Mélanges de molécules	Condition				
	1	2	3	4	5
CIP + $TAM_{att.}$	2.14	4.39	5.51	5.71	7.07
CIP + $TAM_{obs.}$	8.77 ± 1.14	6.41 ± 1.17	5.14 ± 1.95	3.44 ± 0.58	3.46 ± 0.72
$CTC_{att.}$	2.14	4.39	5.51	5.71	7.07
$CTC_{obs.}$	2.70 ± 0.7	2.82 ± 2.19	2.82 ± 1.08	3.12 ± 0.91	4.61 ± 1.24

Tableau 13 : Comparaison entre les valeurs additives du nombre d'adduits attendus et ceux observés avec des cellules mammaires MCF-7 exposées pendant 24 h à des mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP + TAM) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC).

Concernant l'exposition des cellules HepG2 à des concentrations croissantes des trois molécules en mélange, on constate la formation d'un seul adduit à l'ADN dont les caractéristiques correspondent à l'adduit #1 (figure 48.D). Dans ce cas de figure, nous avons un effet d'antagonisme puisque l'adduit #2 n'est plus formé, et que globalement le taux d'adduits est bien plus faible que lors de l'exposition au TAM seul (figure 50). Mais on peut tout de même noter que les valeurs absolues d'adduits formés semblent décrire une réponse légèrement dose-dépendante, avec un nombre d'adduits formés par les fortes doses (condition 5) significativement plus important (p<0,05) que les faibles doses (condition 1). On peut également constater les conditions 1 et 2 des mélanges CTC induisent significativement moins (p<0,05) d'adduits que les mélanges CIP + TAM (tableau 13).

II.3.2. Analyse de la formation d'adduit à l'ADN sur cellules mammaires (MCF-7)

L'exposition des cellules mammaires MCF-7 à la ciprofloxacine et au cyclophosphamide n'induit pas d'adduits à l'ADN, et ce quelle que soit la concentration. *A contrario*, le tamoxifène induit la formation d'un adduit unique (#4) qui est différent de ceux observés dans les cellules hépatiques. Un exemple de profils types obtenus après l'exposition des cellules sont donnés figure 51.

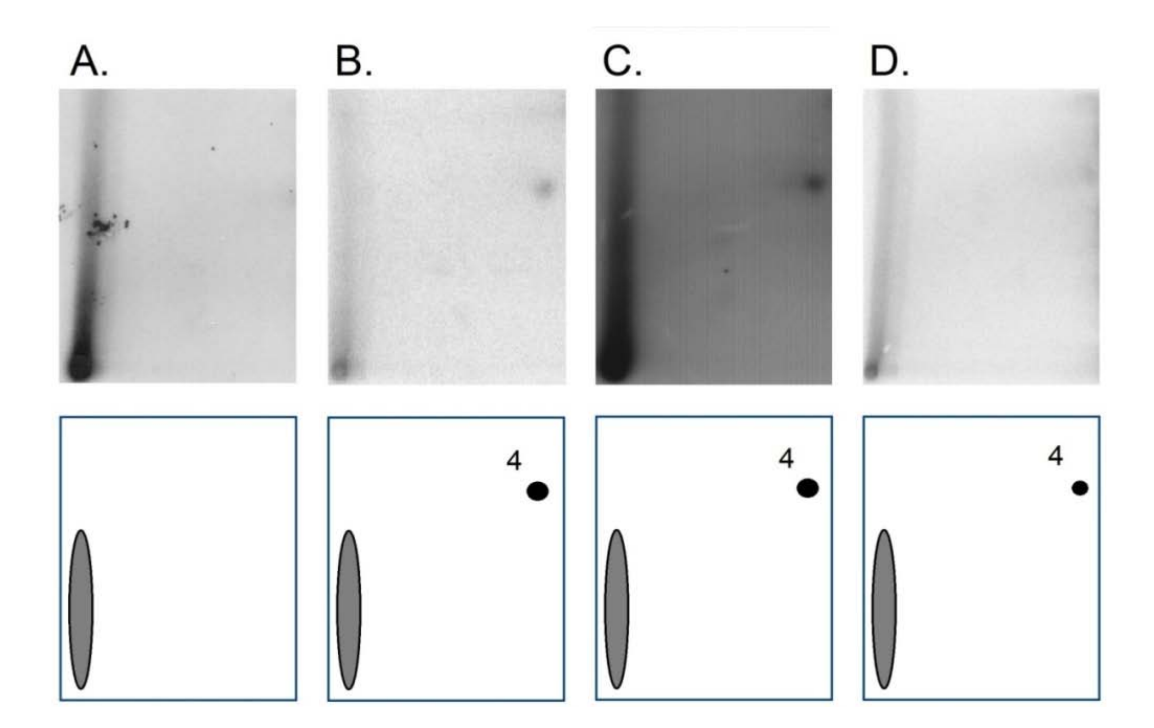


Figure 51 : Exemple de Profils d'adduits à l'ADN de cellules mammaires MCF-7 exposées à différentes conditions pendant 24h: (A) contrôle ; (B) cellules exposées au TAM; (C) cellules exposées aux mélanges CIP + TAM ; (D) cellules exposées aux mélanges CTC.

Une relation dose-réponse non monotone (courbe en U inversé) est observée lorsque les cellules MCF-7 sont exposées au tamoxifène (figure 52). Les deux concentrations intermédiaires de la gamme induisent significativement des adduits (p<0.01). L'exposition à 0,5 µg/L de tamoxifène induit deux fois plus d'adduits à l'ADN (p<0,01) comparé à une concentration de 1 µg/L. Les autres concentrations n'induisent pas de génotoxicité significative.

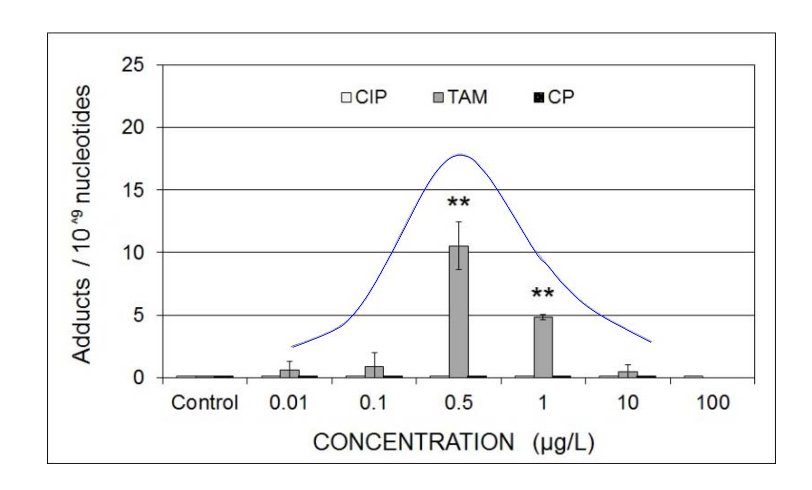


Figure 52 : Taux d'adduits à l'ADN par 10^9 nucléotides formés chez des cellules mammaires MCF-7 exposées 24 h à différentes concentrations de ciprofloxacine (CIP), tamoxifène (TAM) et cyclophosphamide (CP). Les résultats sont exprimés en moyennes et considérés statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

Quel que soit le type de mélange de molécules (binaire ou ternaire), on observe la formation significative d'adduits à l'ADN (figure 53). Les mélanges CIP + TAM induisent une augmentation dose-dépendante significative (p<0,01) allant de 3 à 20 adduits/ 10^9 nucléotides. On note que la réponse de génotoxicité observée ici est très différente de celle obtenue après une exposition au tamoxifène seul.

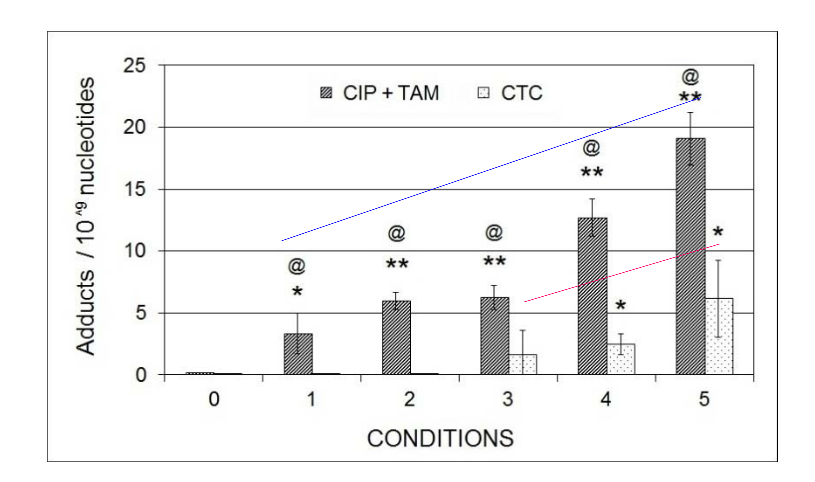


Figure 53 : Taux d'adduits à l'ADN par 10^9 nucléotides formés dans les cellules mammaires MCF-7 exposées 24 h à différentes mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP + TAM, gris) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC, blanc). Les résultats sont exprimés en moyennes et considérés significatifs à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) ; différence significative à p<0,05 (@) entre les mélanges CIP + TAM et CTC.

Mélanges de molécules	**Condition**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
CIP + $TAM_{att.}$	0.61	0.88	10.53	4.83	0.48
CIP + $TAM_{obs.}$	3.34 ± 1.65	5.96 ± 0.70	6.23 ± 0.96	12.67 ±1.50	19.64 ± 2.13
$CTC_{att.}$	0.61	0.88	10.53	4.83	0.48
$CTC_{obs.}$	0	0	1.65 ± 1.92	2,47 ± 0.83	6.15 ± 3.10

Tableau 14 : Comparaison entre les valeurs additives du nombre d'adduits attendus et ceux observés avec des cellules mammaires MCF-7 exposées pendant 24 h à des mélanges de ciprofloxacine + tamoxifène (CIP + TAM) et ciprofloxacine + tamoxifène + cyclophosphamide (CTC).

A partir des valeurs d'additivité attendues comparées à celles mesurées (tableau 14), on constate un phénomène de potentialisation pour les conditions 1 et 2, et encore plus prononcé pour les conditions 4 et 5, lorsque la ciprofloxacine est présente en mélange. *A contrario*, les doses mélangées pour la condition 3 induisent un effet antagoniste, avec un taux d'adduits environ 2 fois moins important comparé à une exposition au tamoxifène seul.

Bien que la formation d'adduits à l'ADN soit elle aussi dose-dépendante ($p<0,05$) lorsque les trois molécules sont présentes simultanément en solution (CTC), les résultats montrent clairement que la génotoxicité est significativement plus faible ($p<0,01$) que celle induite par les mélanges CIP + TAM (figure 53). La comparaison globale entre les types de mélanges (binaires et ternaires) met en évidence l'effet antagoniste du cyclophosphamide en mélanges. De plus, on peut noter là aussi une réponse de génotoxicité différente comparée à une exposition au tamoxifène seul. En effet, les conditions 1, 2, 3 et 4 des mélanges CTC induisent peu ou pas de formation d'adduits à l'ADN, tandis que l'exposition des cellules à la condition 5 aboutit à un taux d'adduits plus de dix fois supérieure.

DISCUSSION

Le but de ce chapitre était de sélectionner un ou plusieurs bioessais ou biomarqueurs qui permettraient de caractériser un effluent et de suivre son épuration. Nous nous sommes intéressé à trois médicaments fréquemment utilisés dans les protocoles anticancéreux et faisant partie de classes de médicaments différentes : la ciprofloxacine, un antibiotique ayant des propriétés anticancéreuses par elle-même ; le tamoxifène, un régulateur endocrinien qui est un médicament de choix en hormonothérapie ; le cyclophosphamide, un agent alkylant utilisé en chimiothérapie dans une majorité de cancers.

Les tests choisis reflètent soit un effet toxique aigu (Microtox® et viabilité cellulaire à 24 h) soit un effet toxique chronique (Algaltox F™, *Lemna*, viabilité cellulaire à 72 h). L'impact des substances sur la viabilité des organismes fait suite à un effet biologique précoce pouvant être une altération du statut hormonal ou une altération du patrimoine génétique. Le test YES/YAS peut être considéré comme un biomarqueur signant une perturbation endocrinienne et une génotoxicité, les cassures à l'ADN (test comète) et les adduits à l'ADN sont des marqueurs de génotoxicité (altération de l'ADN pouvant entrainer une mauvaise expression des gènes). La dérégulation des hormones et/ou de l'expression génique ont pour conséquence une modification de la viabilité cellulaire signant une adaptation plus ou moins réussie

Le but de notre étude n'étant pas d'évaluer le mécanisme d'action mais d'appréhender le risque posé par ces molécules dans l'environnement, les gammes de doses testées étaient bien plus basses que les doses thérapeutiques. Elles ont été adaptées en fonction des données disponibles de contamination des eaux à la sortie des hôpitaux, en entrée et sortie de STEP, ainsi que dans les rivières. D'autre part comme un contaminant n'est jamais seul, nous avons testé deux types de mélanges, un mélange binaire et un mélange ternaire. Le choix d'étudier la toxicité de ces molécules sur des cellules humaines en culture à deux justifications : la première est que nous savons que chez les malades ces médicaments sont métabolisés en produits biologiquement actifs qui seront excrétés dans les urines. Ce sont en fait eux que l'on retrouve dans les effluents et qui ne sont pas tracés. La deuxième raison est que ces faibles doses de molécules pourraient aussi affecter les humains « sains » exposés soit en milieux hospitalier (infirmiers, aides-soignantes, technicien de surface, etc.), soit par l'eau de boisson, soit encore de manière ponctuelle par les eaux de baignades par exemple.

Les cellules hépatiques ont été choisies car elles comportent tous les systèmes de métabolisation (CYP P450, glucuroconjugaison, etc.) qui permettent de refléter ce qui se passe dans l'organisme. Les cellules des glandes mammaires sont quant à elles un modèle de choix pour mimer un effet perturbateur endocrinien. Elles possèdent les récepteurs aux œstrogènes et la mesure de la viabilité est le reflet de cette activité. D'autre part, d'un point de vue métabolique elles sont pauvres en CYP P450 à l'exception des CYP1A1 et CYP1B1 qui sont inductibles dans ces cellules, et qui n'existent pas dans les cellules hépatiques. Les cellules MCF-7 expriment aussi les aromatases permettant spécifiquement la métabolisation des œstrogènes ; des NADP quinones réductase impliquées dans la métabolisation des catéchols formés à partir des œstrogènes. Ces cellules sont aussi riches en cyclooxygénase, aussi appelé prostaglandines synthétase.

	TESTS DE VIABILITE						
	Microtox® *(toxicité aiguë)*	**Algaltox F™** *(toxicité chronique)*	***Lemna minor*** *(toxicité chronique)*	**Viabilité cellulaire (MTS)** *(toxicité aiguë et chronique)*			
				Hépatique (HepG2)		Mammaire (MCF-7)	
	30 '	72 h	7 j	24 h	72 h	24 h	72 h
CIP	Inhibition à 100 µg/L	0	Inhibition	Inhibition	Inhibition (hormèse)	0	0
TAM	0	Croissance	0	Inhibition	Inhibition (hormèse)	0	0
CP	0	Inhibition puis prolifération (hormèse)	Inhibition	Inhibition à 10 µg/L	Inhibition (hormèse)	Prolifération à 10 µg/L	Inhibition
CIP+TAM	Inhibition (hormèse)	Inhibition	Inhibition (hormèse)	Inhibition	Inhibition (hormèse)	0 *	0 *
CTC	Inhibition (antagonisme)	Inhibition	Inhibition (antagonisme)	Inhibition aux fortes doses	Inhibition (hormèse)	0	0
Commentaires	L'activité antimicrobienne de CIP peut expliquer l'inhibition.	Ces 2 tests révèlent des effets aquatiques délétères chroniques sur les organismes photosynthétiques.		Effets chroniques plus prononcés et apparition de phénomènes d'hormèse.		inhibition induite par CP pourrait être dû à une modulation de l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques. * En dose inversée, on note une inhibition (hormèse).	

Tableau 15 : Comparaison des résultats obtenus *via* l'utilisation de bioessais reflétant les effets aigus (viabilité bactérienne et cellulaire humaine) et chroniques (inhibition de la croissance algale et lenticulaire) ; 0 : aucune toxicité n'a été observée.

	BIOMARQEURS DE GENOTOXICITE							
	Test YES/YAS		**Test des comètes**				**Post-marquage des adduits au ^{32}P**	
	Récepteur hERα (œstrogénique)	Récepteur hAR (androgénique)	Cell. Hépatique (HepG2)		Cell. Mammaire (MCF-7)		Cell. Hépatique (HepG2)	Cell. Mammaire (MCF-7)
	48 h		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	24 h
CIP	0	0	0	0	0	0	0	0
TAM	Agonisme / Antagonisme	Antagonisme	0	0	0	0	Formation d'adduits dose-dépendante	Dose-réponse non monotone (hormèse)
CP	0	0	0	0	0	0	0	0
CIP+TAM	0	0	Cassuresdose-dépendantes	Cassuresdose-dépendantes (atténuation)	0	0	Dose-réponse non monotone (hormèse)	Formation d'adduits dose-dépendante
CTC	Antagonisme	Antagonisme	Plateau de génotoxicité	Plateau de génotoxicité (atténuation)	0	0	Formation d'adduits dose-dépendante	Formation d'adduits dose-dépendante
Commentaires	Seule la forte dose des gammes testées est l'origine de la toxicité		Aucune cassures à l'ADN induite par les molécules respectives, indépendamment du temps et de la lignée cellulaire.				Apparition d'effets synergiques et antagonistes selon la présence de CIP et / ou CP en mélange.	

Tableau 16 : Comparaison des résultats obtenus *via* l'utilisation de biomarqueurs de génotoxicité reflétant les effets aigus et chroniques ; 0 : aucune toxicité n'a été observée.

On constate que quelque soit le test utilisé, ils répondent tous à au moins un médicament dans les gammes de concentration testées.

La ciprofloxacine affecte la viabilité des bactéries, des plantes aquatiques et des cellules hépatiques, par contre elle n'est pas génotoxique (cassures, adduits encombrants).

Le tamoxifène affecte d'une part part le métabolisme des cellules hépatiques qui se traduit par une inhibition de la viabilité, mais également celui des algues qui se traduit par un phénomène de prolifération. Le tamoxifène, connu pour son effet perturbateur endocrinien, est le seul à répondre dans le test YES/YAS (agoniste/antagoniste des récepteurs hERα et hAR). Il est également génotoxique par la formation d'adduits encombrants dans les deux types cellulaires, mais de nature différente selon la cellule.

Quant au cyclophosphamide, il affecte la viabilité des algues, des plantes aquatiques et des cellules hépatiques et mammaires. Par contre aucune réponse pour les tests de génotoxicité n'est observée aux doses utilisées. L'absence de formation de cassure à l'ADN lorsque les cellules sont exposées aux molécules isolément est en accord avec les études de Uhl *et al.* (2000) et Yusuf *et al.* (2000) sur cellules hépatiques, et Perry *et al.* (1995) et Ohno *et al*. (2008) sur cellules MCF-7, qui ont rapporté avec le même test l'apparition d'effets génotoxiques du tamoxifène et du cyclophosphamide seulement pour des doses proches du milligramme par litre

Les différences de réponse de nos médicaments observées avec l'ensemble des tests indiquent que la métabolisation des molécules joue un rôle prépondérant dans l'induction de la toxicité. Ceci est flagrant dans l'analyse des adduits, où l'on constate clairement que les profils d'adduits sont différents entre les lignées cellulaires qui ne possèdent pas le même patrimoine enzymatique. La métabolisation conduit à plusieurs métabolites potentiellement génotoxiques à l'origine de la formation d'adduits de nature différente. D'autre part, la modulation du profil des adduits avec les mélanges est liée aux interactions des molécules sur les voies de métabolisation des unes et/ou des autres.

En effet, nos molécules ne sont pharmacologiquement actives qu'après métabolisation. Lors de cette métabolisation plusieurs formes chimiques intermédiaires sont formées. Bien qu'elles n'aient pas d'activité pharmacologique, elles peuvent néanmoins avoir une activité biologique sur des organismes non cibles.
La ciprofloxacine est métabolisée en quatre métabolites identifiés, et dont la majorité (75 %) est excrétée dans les urines : la deséthylciprofloxacine, la sulfociprofloxacine, l'oxociprofloxacine et la formylciprofloxacine (voir figure 9). Bien que les voies de métabolisation aboutissant à la formation de ces molécules soient mal connues, elles présentent toutes des activités antimicrobiennes de par leur forte réactivité.

Le tamoxifène, doit être métabolisé par les cytochromes P450 pour induire des effets hormonaux *via* des métabolites anti-œstrogéniques plus actifs que le composé parent (Coezy *et al.*, 1982). Les principaux métabolites du tamoxifène sont les N-déméthyltamoxifène (formés par le cytochrome CYP3A), le 4-hydroxytamoxifène (4-OH-TAM) et l'endoxifène (formé par le cytochrome CYP2D6) (Desta *et al.*, 2004). Ces différents métabolites sont pris en charge par l'hydroxysteroïde

sulfotransferase (Shibutani *et al.*, 1998 ; Nishiyama *et al.*, 2002) et deviennent réactif vis-à-vis de l'ADN (Gamboa da Costa *et al.*, 2001, 2007). Il a été montré que suivant le métabolite formé, la nature des adduits était différente. Trois adduits proviennent de la sulfoconjugaison des métabolites primaires (figure 55). Ces adduits sont mutagènes. Le 4-OH-TAM peut aussi être oxydé en catéchol puis en O-quinone. Ce métabolite est capable de former un adduit (Dowers *et al.*, 2006). Ce dernier type de métabolisation s'effectue suivant un mécanisme analogue à la métabolisation des œstrogènes, par intervention notamment de l'aromatase et de quinone réductase présentes dans les tissus extra-hépatiques tel que les glandes mammaires (Wong & Chen, 2012).

Figure 54 : Voie de métabolisation du tamoxifène aboutissant à la formation d'adduits à l'ADN (d'après Shibutani *et al*., 2003, Gamboa Da Costa *et al*., 2001, 2007).

Pour ce qui est du cyclophosphamide, il n'est pas cytotoxique par lui-même et doit également être activé par métabolisation *in vivo*. Plusieurs métabolites sont connus (Kerbusch *et al*., 2001), dont les principaux sont le chloroacétaldéhyde, l'acroléine et le 4-hydroxy-CP produit par l'action conjointe de différents cytochromes P450 présents dans les microsomes hépatiques (Huang *et al*., 2000). Les métabolites actifs dérivent du 4-hydroxy-CP produit principalement par le cytochrome CYP2B6 (Chang

et al., 1993). Il s'agit des moutardes phosphoramides qui forment des pontages entre les brins d'ADN et sont à l'origine de la cytotoxicité des cellules (Bohnenstengel *et al*., 1996). L'acroléine quant à elle est responsable d'alkylation de l'ADN. La réparation de ces alkylations conduit à des sites apuriniques et des cassures d'ADN. Il a été montré que l'acroléine à faible concentration inhibait la prolifération cellulaire sans provoquer la mort cellulaire. Elle joue sur des facteurs de transcription comme NFkB et AP1, activant l'apoptose (Keher et Biswal, 2000). La N-déchloroéthylation conduit à la perte de l'activité anticancéreuse du cyclophosphamide et à la formation de composés toxiques tels que le chloroacetaldéhyde. Cette réaction est catalysée par le cytochrome CYP3A4. Tous ces métabolites sont excrétés dans les urines.

Dans notre étude, l'importance de ce phénomène de métabolisation est clairement observée lors des analyses des mélanges, notamment lors de la formation des adduits à l'ADN. De même, dans certains tests, aucune réponse n'était observée alors qu'en mélange tous les tests répondent.

Les interactions médicamenteuses sont souvent liées à une interaction des voies de métabolisation (Micheaud & Turgeon, 2010 ; Zanger & Schwab 2013) mais aussi sur les transporteurs (Zamek-Gliszczynski *et al*., 2006). La ciprofloxacine module l'activité des CYP (Janknegt, 1990). Chez l'homme, elle inhibe le CYP1A2 (Fuhr *et al*., 1993) et les CYP3A (Xie *et al*., 2003), ainsi que la β-glucuronidase (Kodawara *et al.,* 2014).
De même, le tamoxifène et ses métabolites actifs N-déméthyltamoxifène et 4-hydroxytamoxifène inhibent les cytochromes CYP2B6, CYP2C9 et CYP2D6 (Sridar *et al*., 2002) alors qu'ils augmentent l'activité du cytochrome CYP3A (Desai *et al*., 2002 ; Sane *et al*., 2008). L'induction des enzymes par le TAM est régulé par le PXR (pregnane receptor) et le recepteur à l'androstane (CAR). Une exposition à des doses faibles de TAM conduit à l'induction des enzymes (CYP, FMO) et d'une modification du profile métabolique (Kisanga *et al*, 2005). Ces différents CYP sont impliqués dans la métabolisation des trois molécules. Leur modulation va de ce fait modifier les voies de métabolisation de chacun d'entre eux (figure 55).

Dans le cas des mélanges binaire (CIP + TAM), l'interaction pourrait aussi être due à l'impact du tamoxifène sur les échanges membranaires. En effet, Darvari & Boroujerdi (2004) ont montré que le tamoxifène modulait de manière biphasique le transport membranaire de la doxorubicine (un antibiotique semblable à la ciprofloxacine). Néanmoins, la modulation des réponses semble directement liée à l'interférence de chacun des molécules sur les enzymes de métabolisation.

L'inhibition des CYP3A4 par la CIP, va favoriser la formation du 4-OH-TAM qui a les propriétés endocriniennes et qui peut être transformé en dérivé quinone capable de former un adduit. La stimulation du CYP3A4 va au contraire favoriser la formation des formes déméthylées qui après sulfoconjugaison par la sulfotransférase SULT A2 vont conduire à deux adduits. Il est intéressant de noter que lorsque les cellules hépatiques ont été exposées au TAM seul, on observe deux adduits. Ceci est en accord avec les études *in vivo* et sur culture d'hépatocytes (Gambacoa *et al*., 2007 ; Schild *et al*., 2003). En présence de CIP, nous n'avons qu'un seul adduit, mais de nature différente, montrant bien qu'il y a eu une déviation des voies de métabolisation. L'inhibition de la voie CYP3A4 par la CIP peut avoir favoriseé la formation de 4-OH TAM pouvant aussi générer un adduit.

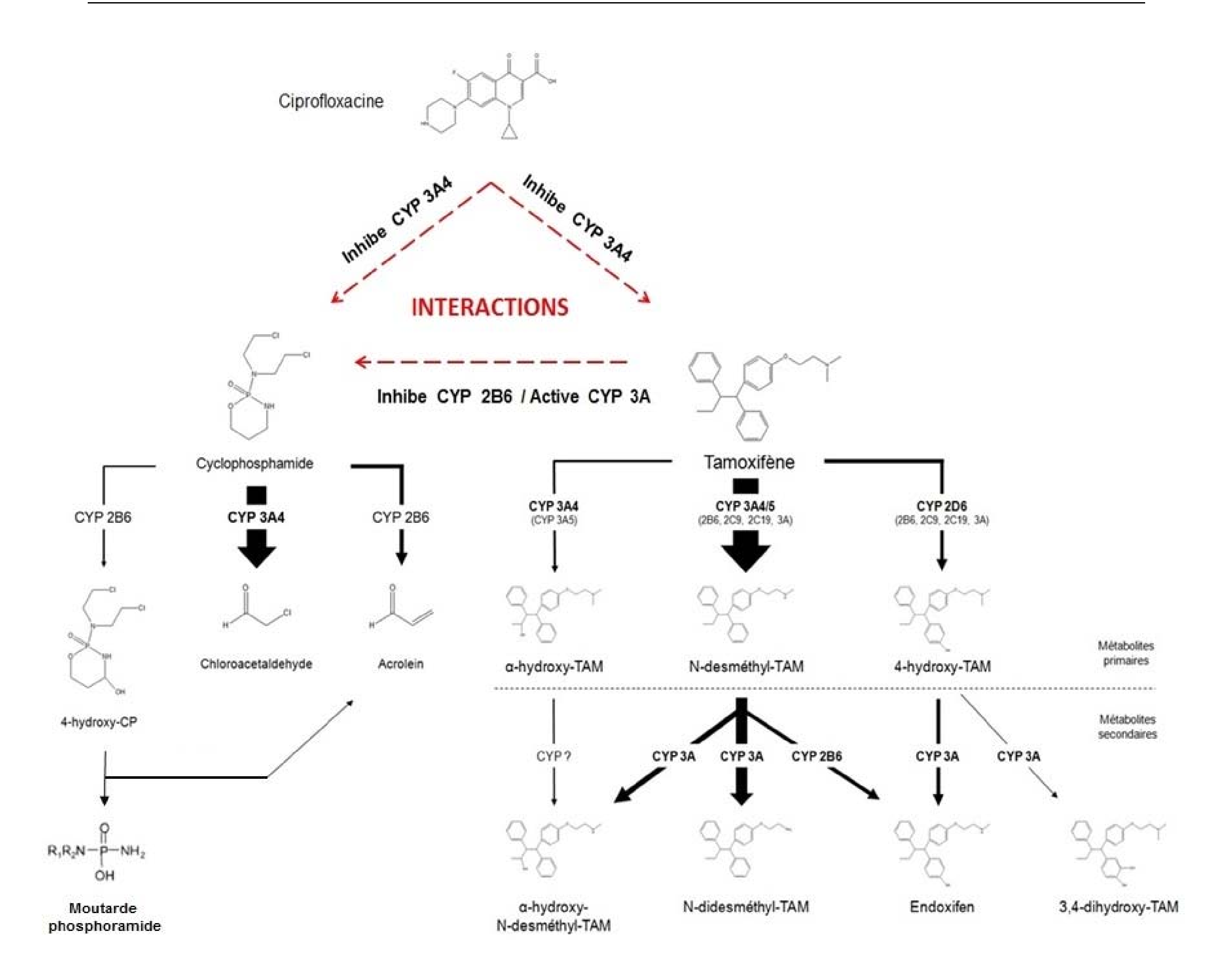


Figure 55 : Schéma possible d'interaction entre les molécules en mélange au niveau des différentes voies de métabolisation, proposé à partir des voies de métabolisation du cyclophosphamide mis en évidence par Huang *et al.* (2000) et celle du tamoxifène par Desta *et al.* (2004)

Les deux molécules étant prises en charge par les sulfotransférases, en plus de l'interférence sur les CYP, il y a également compétition entre elles pour les sulfotransférases. Le métabolite le plus actif de la CIP est la sulfociprofloxacine. Le TAM peut être aussi conjugué à l'acide glucuronique. Une diminution de la potentialité du TAM à être sulfoconjugué, car les enzymes sont utilisés pour la sulfoconjugaison de la CIP, va favoriser la voie de glucuronation du TAM. D'autre part, le 4-OH-TAM formé au niveau des tissus extrahépatiques, va être transformé en catéchol puis en O-quinone. Dans les cellules des glandes mammaires où ces enzymes sont principalement exprimés nous n'avons observé la formation que d'un seul adduit de nature différente aux précédents.

Lors des expositions aux mélanges des trois molécules ensemble, les interactions s'expliquent aussi par des interférences sur les enzymes de biotransformation.

Par exemple, une inhibition du CYP3A4 par la ciprofloxacine, favorisera la formation préférentielle de 4-OH-TAM ayant les propriétés endocriniennes d'une part ; et l'acroléine et le 4-OH-CP d'autre part (figure 55) à l'origine de cassures de l'ADN. L'adduit dG-acroléine a déjà été décrit comme étant considérablement plus mutagène pour les cellules de mammifères que chez la bactérie (*E. coli*), mais

les polymérases mammaliennes ont été décrites comme étant capable de palier les lésions dG-acroléines en présence d'antigène lors de la prolifération cellulaire (Kanuri *et al*., 2002). Le TAM quant à lui en inhibant le CYP2B6 et induisant le CYP3A4 favorise la formation essentiellement de chloroacétaldhéhyde qui est cytotoxique.

L'interférence des molécules entre elles sur leur métabolisation explique la réponse observée avec le test YES/YAS, où seule la plus forte dose de tamoxifène entraine un effet agoniste sur les récepteurs hER-α, tandis que le témoin positif anti-YES utilisé qui est le 4-OH-TAM, un métabolite du tamoxifène, entraine une réponse antagoniste très prononcée et à de très faibles doses comparé à la molécule mère. Lorsque le TAM est combiné au CIP et/ou au CP, il y a disparition de l'effet œstrogénique.

Nous avons également pu constater avec les cellules humaines que la réponse de génotoxicité est dépendante du type cellulaire utilisé. Ainsi, une simple exposition des deux types de lignées cellulaires au tamoxifène (seul) induit la formation dose-dépendante d'adduits sur les cellules hépatiques HepG2, l'apparition d'un phénomène d'hormèse dans la formation des adduits sur les cellules mammaires MCF-7, mais aucune cassure à l'ADN sur les deux lignées. La réponse est tout autant complexe lorsque les cellules sont exposées à des mélanges, puisqu'une exposition de 24 h des cellules HepG2 aux mélanges binaires (CIP + TAM) entraine une formation d'adduits à l'ADN non monotone (hormèse), alors que c'est une réponse génotoxique dose-dépendante de forte intensité qui est observée avec les cellules MCF-7. Ces résultats soulignent des cibles et modes très différents pouvant donc bien être la résultante d'interactions complexes entre les molécules en mélange.

L'ensemble de ses modifications au niveau de l'ADN explique les effets observés sur la formation de cassure (phénomène de réparation) et sur la viabilité cellulaire avec la mutation des gènes tels que le gène p53 (suppresseurs de tumeurs), ou l'induction de l'apoptose. Bien que la CIP soit utilisée principalement comme antibiotique pour son action inhibitrice des topoisomérases/gyrases bactériennes de type II, les travaux menés par Herold *et al.* (2002) ont montré que l'exposition à la ciprofloxacine pouvait affecter la viabilité de certaines lignées cellulaires eucaryotes. Les causes peuvent, entre autre, être dues à une interaction directe de la molécule avec la membrane mitochondriale et une inhibition non sélective de la synthèse d'ADN mitochondrial (Lawrence *et al.,* 1993). Une baisse des mitochondries en entrainant une diminution de la concentration en ATP pourrait favoriser l'apoptose cellulaire *via* l'arrêt du cycle cellulaire S/G2-M en concomitance avec une diminution des cyclines B et E, une déphosphorylation de cdk2 et une surexpression du facteur pro-apoptotique Bax. La capacité de la ciprofloxacine à interférer sur la voie de signalisation de Bax a été mise en évidence sur des cellules cancéreuses humaines de vessie (Aranha *et al*., 2000).

Un phénomène d'apoptose des cellules HepG2 exposées à des doses supérieures au microgramme par litre de tamoxifène a été décrit par Brandt *et al.* (2004, 2005). Les résultats ont démontrés que le tamoxifène dérégulait l'activité télomérase des cellules entrainant l'apoptose.

L'importance de la métabolisation avait déjà été observée avec le test de viabilité cellulaire, où les cellules mammaires n'avaient pas « répondu » contrairement aux cellules hépatiques, ou encore avec la différence de réponse de toxicité entre molécule seule et en mélange avec les bioessais.

Ainsi, on observe dans le cas du Microtox® qu'il ne permet pas de détecter la toxicité respective des molécules (sauf pour une dose de 100 µg/L de ciprofloxacine), alors que les mélanges induisent une inhibition de la bioluminescence. Bien que très peu de données soient disponibles concernant l'impact de ces molécules sur cette bactérie marine, des études menées sur la ciprofloxacine par Martins *et al.* (2008, 2012) montrent une induction d'effets aigus et sublétaux à dose thérapeutique chez plusieurs espèces aquatiques. Cependant, aucune information n'est disponible, ni sur la toxicité de doses inférieures au microgramme par litre, ni sur des mécanismes d'action précis. L'impact de la ciprofloxacine sur les lentilles d'eau observé dans notre étude et par d'autres (Migliore *et al.*, 2003) peut être mis en parallèle avec l'impact sur les bactéries. Ceci pourrait s'expliquer par la conservation dans l'évolution des chloroplastes et mitochondries originellement issus de bactéries, dont la ciprofloxacine pourrait bloquer la réplication (Brain *et al.*, 2009).

Pour le test Algaltox F™, on remarque principalement l'apparition d'une prolifération avec le tamoxifène et le cyclophosphamide, tandis que les mélanges induisent là encore une inhibition de la croissance. Aucune toxicité chronique n'est observée avec des traitements de ciprofloxacine, ce qui confirme les résultats obtenus dans plusieurs études précédentes où seules des doses supérieures à 1 mg/L induisaient une toxicité (Lindeberg *et al.*, 2007 ; Liu *et al.,* 2011). Il est intéressant de noter qu'à l'heure actuelle seules quelques études relatent une toxicité du cyclophosphamide mais pour des doses supérieures au microgramme par litres (Zounkova *et al.*, 2007). Néanmoins, ces approches ne reflètent pas les conditions environnementales où les organismes sont soumis à des doses sub-thérapeutiques. D'autre part, bien que la valeur prédite de concentration du cyclophosphamide n'entrainant aucun effet (PNEC) ait été estimée à 1,12 mg/L pour *P. subcapitata,* Grung *et al*., (2008) insistent sur le manque d'information disponible concernant l'écotoxicité de cette molécule et ses mécanismes d'action sur cet organisme non-cible. Une étude menée par Vannini *et al.* (2011) sur les effets en mélanges de molécules thérapeutiques, dont le cyclophosphamide, a permis de montrer un effet délétère sur les chloroplastes de cette algue. Il a notamment été mis en évidence une modification du ratio de chlorophylle « a » par rapport à la chlorophylle « b » ainsi qu'une diminution du taux de Glutamine synthétase (GS). Cette enzyme est impliquée dans l'assimilation d'ammoniaque ou de nitrates du sol ainsi que dans le transport d'azote. Les interactions observées apparaissaient intrinsèquement dépendantes de la nature et de la dose des composés. Bien que notre étude ne soit pas tout à fait comparable, de tels mécanismes d'action pourraient expliquer les résultats obtenus ici.

Seul le test des *Lemna* et de viabilité cellulaire (MTS) décrivent un seul et même type de réponse (inhibition stricte ou hormèse) quelle que soit la condition testée. Cependant la toxicité des mélanges est à chaque fois plus faible comparée à l'analyse individuelle des composés. Par ailleurs, on peut souligner que les mélanges n'induisent pas les mêmes effets chez les modèles d'études utilisés, et que les concentrations des molécules jouent un rôle déterminant dans la réponse de toxicité. C'est le cas notamment pour les mélanges ternaires (CTC) qui induisent plutôt un phénomène d'hormèse chez

la bactérie et les cellules hépatiques (HepG2), mais une inhibition stricte chez l'algue et la lentille d'eau. Les mélanges de CIP + TAM décrivent également cette tendance.

La réponse peut être encore plus complexe lorsque les cellules sont exposées à des doses inverses. Nous avons pu constater par exemple une diminution de la viabilité des cellules mammaires (MCF-7) avec les mélanges en doses inversées, tandis que les mélanges de doses croissantes n'entrainent pas de toxicité.

Dans le cas des cellules humaines, ces variations de la viabilité pourraient s'expliquer par l'interaction de la ciprofloxacine sur les CYP mais également avec une dérégulation de l'expression des protéines p53 impliquées dans le cycle cellulaire. L'incapacité des cellules à s'adapter à un stress génotoxique pourrait entrainer des mutations ou la sous expression de ces protéines, et résulterait au final à un phénomène d'apoptose. C'est d'ailleurs le lien qui a pu être observé entre la mortalité des cellules hépatiques exposées aux mélanges, et l'apparition de cassures à l'ADN sur ce même modèle.

Ces phénomènes d'adaptation sont bien présents puisque nous avons pu voir avec l'application des différents bioessais et biomarqueurs l'apparition de phénomènes d'hormèse. Dans les gammes de concentrations testées (10 ng/L - 10 µg/L), la dose-réponse observée avec les cellules hépatiques exposées à la ciprofloxacine, au tamoxifène et au cyclophosphamide décrit une courbe en U qui s'amplifie à 72 h. Le même type de courbe est observé lorsque les microalgues sont exposées au cyclophosphamide, lorsque que des *Lemna* sont exposées à des mélanges CIP + TAM, ou encore lorsque que les bactéries marines sont exposées à des mélanges binaires ou ternaires de molécules.

Cette relation dose-réponse non linéaire a été définie comme un phénomène d'hormèse et a déjà été décrite dans un large éventail d'organismes (des bactéries aux vertébrés) exposés à plus de 1000 composés chimiques et stresseurs environnementaux. L'hormèse est corrélée à l'acclimatation ainsi qu'à la plasticité phénotypiques des organismes, et peut jouer un rôle essentiel dans l'adaptation à des changements dans l'environnement (Costantini *et al*., 2010). La déviation de la linéarité dans la réponse de toxicité est favorisée par la présence de multiples évènements concomitants. Les mécanismes impliqués dans le phénomène d'hormèse à faibles doses incluent notamment la surcompensation après une perturbation homéostasique ; les réponses adaptatives liées à l'induction des processus de réparation ; les interactions entre prolifération cellulaire, retard du cycle cellulaire, apoptose et dommages à l'ADN ; une activation de la voie de signalisation intercellulaire (jonction GAP) à faible dose mais une inhibition à forte doses ; etc. (pour une revue voir Hoffman, 2009).

L'hormèse est une réponse biphasique en fonction de la dose qui résulte le plus souvent de l'action d'agoniste et d'antagoniste partiels pour les récepteurs mis en jeu. C'est le cas notamment du tamoxifène qui est un perturbateur endocrinien et qui induit des effets agonistes et antagonistes au niveau des récepteurs aux œstrogènes (Coezy *et al*., 1982 ; Vandenberg *et al*., 2012). De faibles doses stimulant l'apparition d'une réponse hormétique pourraient entrainer des effets indésirables dans l'environnement, comme notamment la prolifération de bactéries pathogènes (Randall *et al*., 1947) ou l'activation de la prolifération de cellules tumorales du à certains médicaments anticancéreux (Calabrese *et al*., 2005, 2013). Dans le cas d'agents chimiothérapeutiques, tel que le

cyclophosphamide, la stimulation par les faibles doses semble refléter une adaptation du tissu tumoral.

Les résultats présentés dans cette première partie, obtenus à partir de l'ensemble de ces bioessais et biomarqueurs, confirment à la fois l'importance du choix du test lors d'une analyse de la toxicité mais suggèrent aussi leur utilisation en batterie de test. De plus, au vu des différentes réponses observées, l'analyse individuelle de xénobiotiques, l'évaluation de dose environnementale unique, ou les mesures faites à un seul temps d'exposition permettent difficilement de caractériser un effet précis. On constate dans le tableau 15 que la majorité des résultats où il n'y a pas de toxicité mesurée (pas de réponse) concerne l'analyse faite lors d'exposition aux molécules individuellement. Dans certaines conditions de concentration et/ou de temps d'exposition, des résultats faux-négatifs pourraient donc entrainer des erreurs d'interprétation. Par exemple, si le temps d'exposition est insuffisant pour l'expression de gènes requis pour une réponse adaptative de l'organisme, la mesure trop précoce des effets biologiques pourrait révéler un seuil ou une réponse linéaire de toxicité plutôt qu'un phénomène d'hormèse par exemple. Le rôle prépondérant du facteur temps a notamment été remarqué dans l'amplification de la réponse de toxicité des cellules hépatiques (HepG2) exposées aux différentes conditions testées. A l'inverse un temps d'exposition trop long pourrait aussi conduire à une absence de réponse, car les mécanismes de réparation pourraient avoir déjà acompli leur rôle.

Ces résultats soulignent plus particulièrement la pertinence d'utiliser des biomarqueurs de génotoxicité en complément dans l'évaluation du risque environnemental global. A cet effet, la technique de post-marquage des adduits à l'ADN représente un outil de premier choix. L'utilisation de ce panel d'outils sur différents organismes d'essais, dont des lignées cellulaires humaines, est d'autant plus importante que l'induction d'une réponse (géno)toxique est dépendante à la fois des concentrations et la nature des molécules présentes en mélange, mais également du temps d'exposition choisi pour l'analyse.

Dans le chapitre suivant, nous avons poursuivi notre étude par l'application de cette batterie de tests, afin d'évaluer la toxicité d'effluents hospitaliers et urbains. Seul le test d'inhibition de la croissance de *L. minor* n'a pas pu être réalisé du fait du temps d'expérience assez long pour une évaluation rapide du risque en routine. L'utilisation des autres essais *in situ* pour la caractérisation de la toxicité des effluents est déterminante pour confirmer sa sensibilité et sa pertinence dans l'évaluation du risque des molécules pharmaceutiques dans les milieux aquatiques.

Partie 2

Application de la batterie de tests d'écotoxicité pour la caractérisation et le suivi d'effluents hospitaliers et urbains.

La batterie de bioessais et de biomarqueurs, retenus lors de l'analyse de la toxicité de molécules modèles ciprofloxacine, tamoxifène et cyclophosphamide, a été appliquée à des échantillons bruts d'eaux usées. Ces échantillons proviennent d'une collaboration avec une équipe espagnole de l'ICRA (Catalan Institute for Water Research, Girona, Spain), dans le cadre du projet MBrMed.

La zone géographique de l'étude se situe à Gérone, ville catalane à la frontière avec la France. Les points de prélèvements ont été définis au niveau des effluents de l'hôpital Joseph Trueta de Gérone qui compte environ 400 lits, et de l'entrée et la sortie de la station d'épuration (STEP) en aval du réseau communal d'égouts (figure 56). La station d'épuration récolte la globalité des eaux usées hospitalières ainsi que les eaux résiduelles urbaines, pour une capacité de 100.000 équivalents habitants.

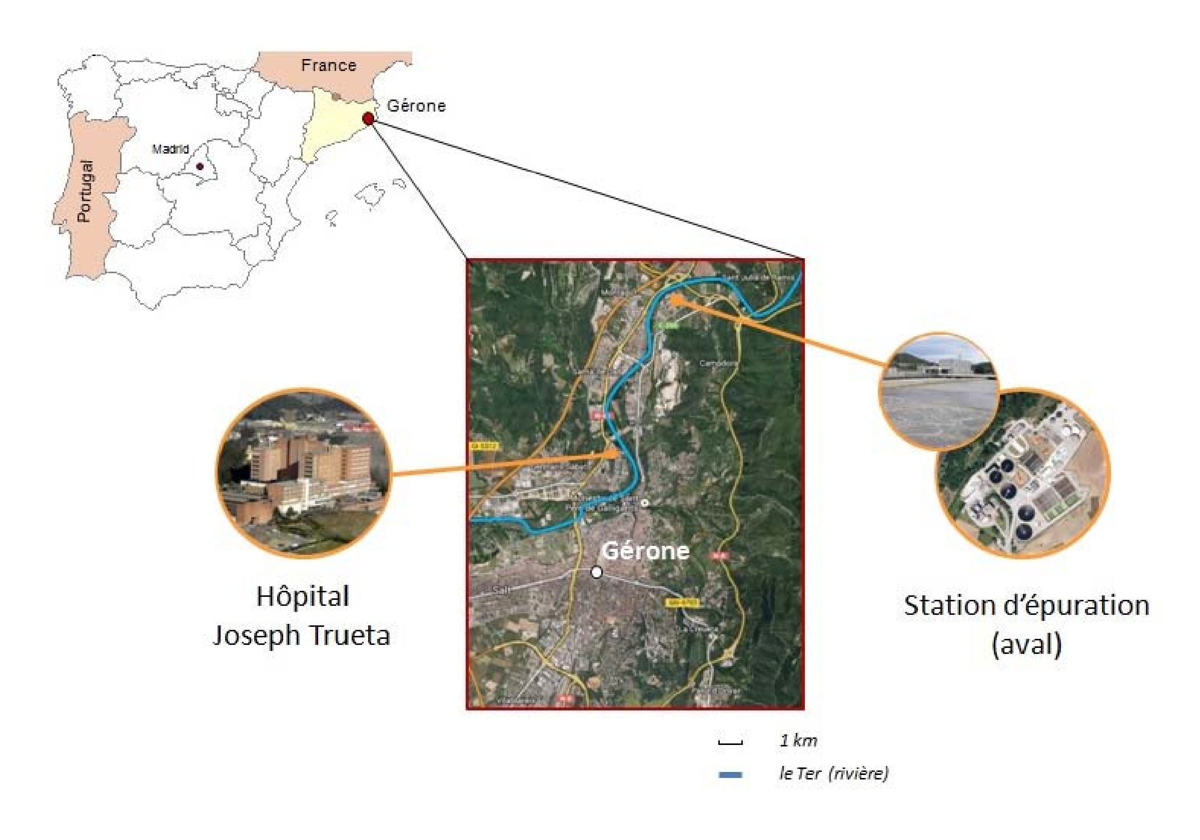


Figure 56 : Situation géographique de la zone d'étude et des points de prélèvements.

Le choix de la saison de prélèvement a été défini en relation avec l'équipe espagnole de l'ICRA en charge des analyses physico-chimiques des échantillons, et a pour but de suivre l'évolution et l'abattement de la toxicité depuis les rejets au niveau de l'hôpital jusqu'aux rejets dans l'environnement après le traitement biologique conventionnel en STEP.

Les échantillons d'eaux ont été collectés pendant trois mois consécutifs, de Novembre 2011 à Janvier 2012, lors de l'administration hebdomadaire des traitements chimiothérapeutiques. Le choix s'est fait en fonction de la période de Noël au cours de laquelle on enregistre une forte diminution des activités chimiothérapeutiques lié aux fêtes de fin d'année. Le niveau de contamination en médicaments étant décroissant entre la période 1 (Novembre) et la période 2 (Décembre) à cause de la diminution des

traitements administrés, on peut supposer un abattement de la toxicité. A l'inverse, la reprise des activités des services oncologiques lors de la période 3 (Janvier) devrait induire une toxicité plus marquée du fait de la présence plus grande quantité et diversité de médicaments rejetés dans les effluents comparé à la période 2.

En effet, l'analyse physico-chimique réalisée par l'équipe espagnole permet tout d'abord de mettre en évidence que les concentrations de médicaments mesurées dans les effluents sont plus faibles en aval de la STEP, mais également que celles-ci sont plus faibles au mois de Décembre (tableau 18). Ces résultats laissent à penser le « profil » de toxicité des échantillons pourrait être différents pour le mois de Décembre. Par ailleurs, on constate que parmi les médicaments détectés, la ciprofloxacine, le tamoxifène et le cyclophosphamide sont présents dans les différents types d'effluents analysés, ce qui conforte la pertinence des molécules retenues dans la partie 1 des travaux de thèse. La nomenclature des échantillons analysés est présentée au travers de la figure 57 et du tableau 17.

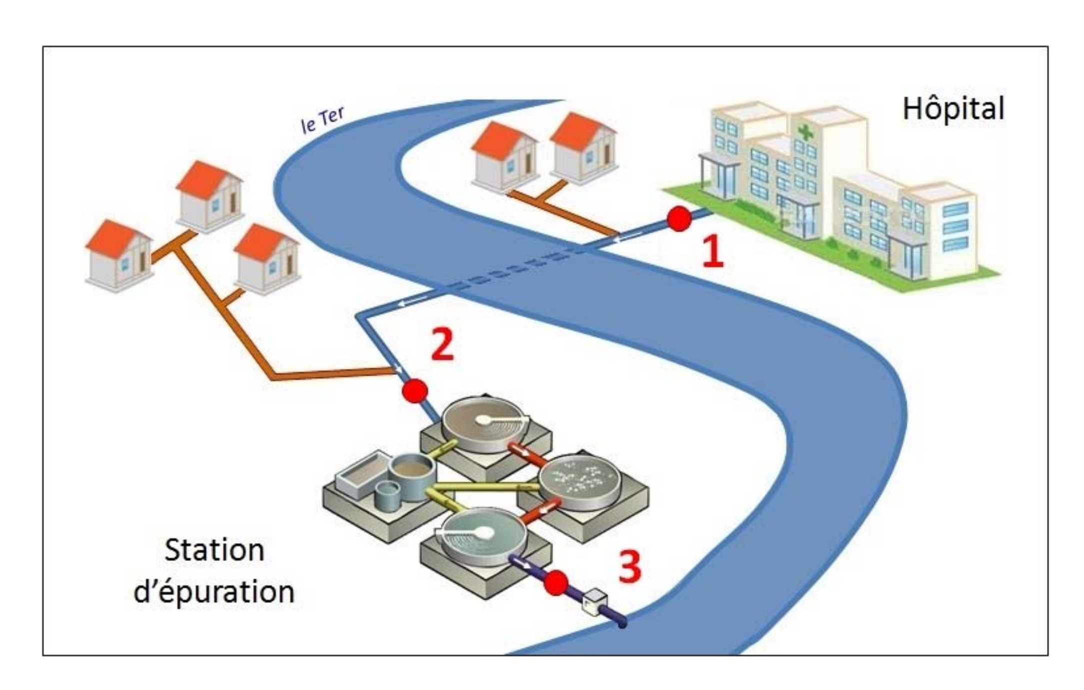


Figure 57 : Représentation schématique de la zone d'échantillonnage.

	SAISON		
Point de prélèvement	**NOVEMBRE** (2011)	**DECEMBRE** (2011)	**JANVIER** (2012)
1	**N.1**	**D.1**	**J.1**
2	**N.2**	**D.2**	**J.2**
3	**N.3**	**D.3**	**J.3**

Tableau 17 : Nomenclature des échantillons d'effluents.

Molécules (ng/L)	NOVEMBRE (2011)			DECEMBRE (2011)			JANVIER (2012)		
	Hôpital	STEP entrée	STEP sortie	Hôpital	STEP entrée	STEP sortie	Hôpital	STEP entrée	STEP sortie
Azathioprine	90 ± 3	20 ± 1	n.d.	lq	n.d.	n.d.	20 ± 2	19 ± 2	n.d.
Ciprofloxacin	7973 ± 210	1172 ± 74	78 ± 11	3089 ± 307	1472 ± 97	36 ± 3	14826 ± 2260	1558 ± 164	147 ± 13
Cyclophosphamide	36 ± 4	26 ± 2	25 ± 3	lq	8 ± 0.2	7 ± 0.3	43 ± 4	14 ± 4	15 ± 3
Docetaxel	79 ± 25	175 ± 39	n.d.	n.d.	65 ± 18	n.d.	61 ± 4	219 ± 57	n.d.
Etoposide	714 ± 37	lq	n.d.	lq	lq	n.d.	367 ± 68	n.d.	n.d.
Ifosfamide	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Methotrexate	6 ± 1	11±2	6 ± 0.1	n.d.	23 ± 2	n.d.	19 ± 5	lq	n.d.
Paclitaxel	59 ± 7	n.d.	n.d.	lq	18 ± 3	lq	100 ± 14	n.d.	n.d.
Tamoxifen	95 ± 2	51 ± 1	42 ± 3	36 ± 1	15 ± 3	11 ± 0.2	170 ± 0.2	58 ± 5	33 ± 0.4
Vincristine	n.d.	n.d.	n.d.	lq	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d : non détecté ; lq : inférieur à la limite de quantification ; STEP : station d'épuration

Tableau 18 : Concentration des principaux médicaments recherchés dans les effluents hospitalier, et les effluents en entrée et sortie de STEP de la ville de Gérone (Espagne) pendant les trois mois consécutifs (d'après Ferrando *et al*., 2013).

Les échantillons issus des effluents hospitaliers (point 1) ont été réalisés le matin entre 10 h et 11 h correspondant aux premières urines du matin, dans lesquels les doses de médicaments seront le plus élevées. Les effluents en entrée de STEP (point 2) ont été prélevés dans la foulée le même jour (distance courte de 9 km entre les points d'échantillonnages). Après un temps de résidence effectif de 27 h, le troisième prélèvement s'est fait en sortie de STEP (point 3). Le but de cet échantillonnage est de caractériser à la fois l'évolution de la toxicité des effluents dans le temps, mais également évaluer efficacité épuratoire de la STEP.

Le matériel utilisé, le mode opératoire de prélèvement, et de préparation des échantillons sont décrits dans les travaux de quantification des contaminants dans l'eau réalisé par Ferrando-Climent *et al.,* (2012, 2013). Brièvement, des bouteilles en verre ambrées et pré-rincées avec de l'eau milliQ ont été utilisées pour l'échantillonnage. Les effluents bruts ont été immédiatement filtrés sur filtre millipore 1 µm, puis 0,45 µm afin d'éliminer les matières en suspensions et autre déchets parasites. Les échantillons ont été stockés dans des récipients en polyéthylène terephtalate (PET) puis conservés congelés à -20°C pendant une période de un mois maximum (FDA, 2011).

Concernant l'exposition des organismes dans nos essais, les volumes des échantillons utilisés sont en accord avec les procédures prévues dans les essais standardisés. Outre le test Microtox® pour lequel le volume d'effluent correspond à plus de 80 % du volume finale analysé, les échantillons d'eaux usées sont équivalents à 10 % du volume final testé avec le test Algaltox F™. Dans le cas de la culture cellulaire, le volume d'effluent ajouté équivaut également à 10 % du volume final de culture. Une proportion plus importante entrainerait une perturbation de la croissance cellulaire du fait de la faible teneur en éléments nutritifs dans le milieu. On notera également que nous n'avons pas voulu évaporer les échantillons pour les rependre dans le milieu de culture, afin de ne pas modifier la matrice de l'échantillon qui peut jouer un rôle dans l'induction d'une réponse de toxicité.

I. Evaluation de la bioluminescence de la bactérie *V. Fischeri* (Microtox®).

Les bactéries marines *Vibrio fischeri* ont été exposées à 5, 15 et 30 min aux différents échantillons d'effluents hospitaliers et d'effluents d'entrée et sortie de STEP. Les resultats mesurés à 5 et 15 min d'exposition présentaient le même profil que ceux obtenus à 30 min, mais d'intensité plus faible. Pour des raisons de simplification de l'analyse, seuls les résultats obtenus à 30 min sont présentés dans la figure 58. Les valeurs sont exprimées en moyenne de 6 points de mesure (3 séries en duplicata). La condition contrôle correspond aux bactéries n'ayant reçu aucun traitement.

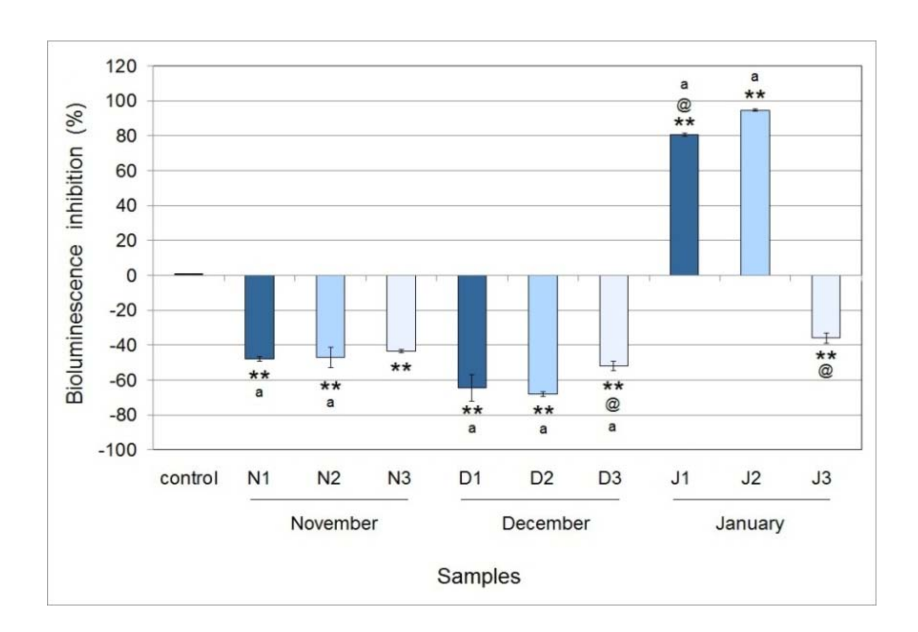


Figure 58 : Inhibition de la bioluminescence de la bactérie*Vibrio fischeri* exposée 30 min à différents échantillons d'eaux (1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée de STEP, (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs. Les résultats sont exprimés valeurs moyennes et sont considérées statistiquement significatives à p<0,01 (**) ; @ différence significative (P<0,01) entre les échantillons prélevés le même mois ; (a) différence significative (p<0,01) entre les périodes de prélèvement.

Quel que soit l'échantillon testé, on constate un impact sur la bioluminescence des bactéries. Les échantillons prélevés en Novembre (N1, N2, N3), Décembre (D1, D2, D3), ainsi que l'échantillon en sortie de STEP prélevé en janvier (J3) augmententsignificativement (p>0,01) la bioluminescence des bactéries de 40 à 60 % comparé au contrôle. Cette augmentation de la bioluminescence liée à une activationde la chaîne respiratoire des bactéries, pourrait s'expliquer par un phénomène de prolifération cellulaire.

Au mois de novembre il n'y a pas de différence significative entre les différentes zones de prélèvement. En décembre, l'augmentation de la bioluminescence est statistiquement plus importante (p<0,01) qu'avec les prélèvements du mois de novembre. L'échantillon en sortie de STEP du mois de décembre induit une prolifération statistiquement moins importante que les autres prélèvements de ce mois. En janvier, on voit clairement une différence entre les 3 zones de prélèvements. Les échantillons en sortie d'hôpital (J1) et en entrée de STEP (J2) inhibent la bioluminescence et donc la croissance de la bactérie. L'échantillon prélevé en entrée de STEP au mois de janvier est significativement plus toxique que l'échantillon provenant de la sortie d'hôpital. Les substances à

l'origine de la toxicité des échantillons J1 et J2 ont été éliminées en station d'épuration, puisqu'on observe une prolifération des bactéries avec l'échantillon J3 prélevé en sortie de STEP.

II. Evaluation de la croissance de l'algue *P. subcapitata* (Algaltox F™)

Des algues d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* ont été exposées pendant 72 h auxdifférents échantillons d'effluents hospitaliers et d'effluents d'entrée et sortie de STEP. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 59. Les valeurs sont exprimées en moyenne de 6 points de mesure (3 séries en duplicata).

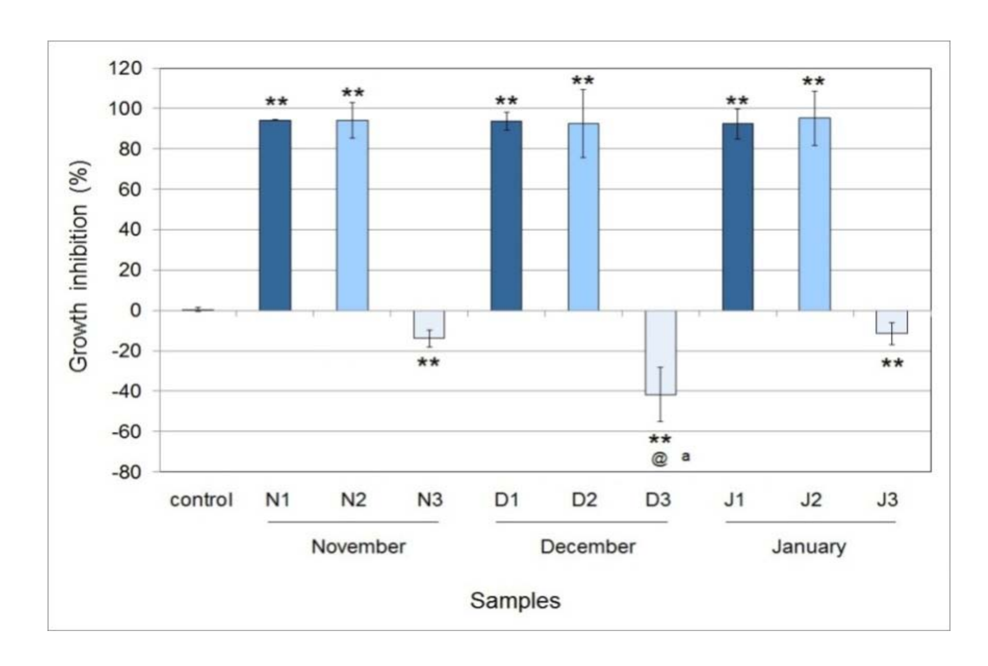


Figure 59 : Inhibition de la croissance de l'algue *P. subcapitata* exposée 72 h à différents échantillons (1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée de station d'épuration (STEP), (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes et sont considérées statistiquement significatives à p<0,01 (**) ; @ différence significative (P<0,01) entre les échantillons prélevés le même mois ; (a) différence significative (p<0,01) entre les périodes de prélèvement.

Quel que soit l'échantillon testé, on constate une inhibition significative (p<0,01) de la croissance algale lors de l'exposition effluents hospitaliers (N1, D1, J1) et aux effluents en entrée de STEP (N2, D2, J2). Le taux d'inhibition avoisine les 95 % par comparaison avec la condition contrôle. Par contre il n'y a pas de différence significative entre les lieux de prélèvement (hôpital / entrée de STEP) ni entre les périodes d'échantillonnage.

A l'inverse, l'exposition aux échantillons issus des eaux en sortie de STEP, entraine une augmentation de la croissance significative (p<0,01), quelle que soit la période de prélèvement, 10 % à 40 % supérieure au contrôle. On note que l'échantillon en sortie de STEP du mois de Décembre (D3) induit une prolifération significativement plus importante (p<0,01) que les prélèvements aux même endroits les deux autres mois. La station d'épuration élimine les substances responsables de la mort des algues.

III. Evaluation de la viabilité de cellules humaines (test MTS).

Des cellules humaines hépatiques (HepG2) et mammaires (MCF-7) ont été exposées pendant 24 h à 72 h à différents échantillons d'effluents hospitaliers et d'effluents d'entrée et sortie de STEP. Les résultats sont exprimés en médiane de 18 points de mesures (3 séries indépendantes de 8 points de mesure).

IV.1. Evaluation de la viabilité des cellules hépatiques (HepG2)

Suite à une exposition des cellules hépatiques pendant 24 h aux différents échantillons d'eau (figure 60.A), on observe que seul l'échantillon d'effluents en entrée de STEP prélevés au mois de Janvier (J2) entraine une prolifération cellulaire significative avoisinant environ 5 %. On peut souligner une tendance à une prolifération suite à l'exposition aux échantillons d'entrée de STEP (N2, D2), même si les valeurs ne sont pas significatives (figure 60.A).

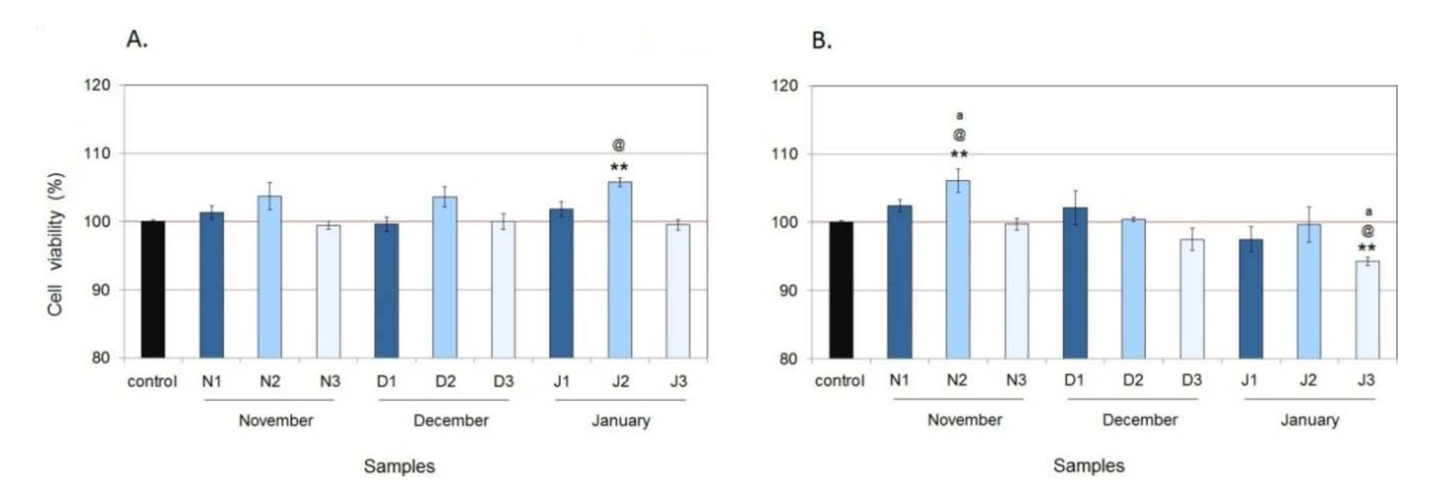


Figure 60 : Taux de viabilité de cellule hépatique HepG2 exposées 24 h [A] et 72 h [B] à différents échantillons (1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée de STEP, (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs. Les résultats sont exprimés en moyennes et sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) ; @ différence significative (P<0,01) entre les échantillons prélevés le même mois ; (a) différence significative (p<0,01) entre les périodes de prélèvement.

Lorsque les cellules sont exposées 72 h à ces échantillons (figure 60.B), uniquement 2 échantillons modifient significativement la viabilité cellulaire. D'une part l'échantillon « N2 » (entrée de STEP prélevé en novembre) induit une prolifération significative (p>0.01) tandis que l'échantillon « J3 » (sortie de STEP prélevé en janvier) entraine une inhibition (p>0.01) de la croissance cellulaire. Les taux de viabilité sont respectivement de 105 % et 95 %.

Bien qu'il n'y ait pas de différence statistique entre les échantillons prélevés au mois de décembre, on constate une tendance à une inhibition de la croissance cellulaire avec l'échantillon D3 (sortie de STEP). Lorsqu'on compare l'impact sur la viabilité cellulaire observé après 24 h ou 72 h d'exposition, on constate une amplification de la prolifération cellulaire induite par l'échantillon N2. L'effet de prolifération induit par l'échantillon J2 a disparu après 72 h d'exposition.

IV.2. Evaluation de la viabilité des cellules mammaires (MCF-7)

Les résultats de la viabilité cellulaire obtenus avec les cellules MCF-7 sont repris dans la figure 61. Les valeurs sont exprimées en médiane de 18 points de mesures (3 séries indépendantes de 8 points de mesure). Aucune toxicité n'est observée ni après 24 h ni après 72 h d'exposition des cellules.

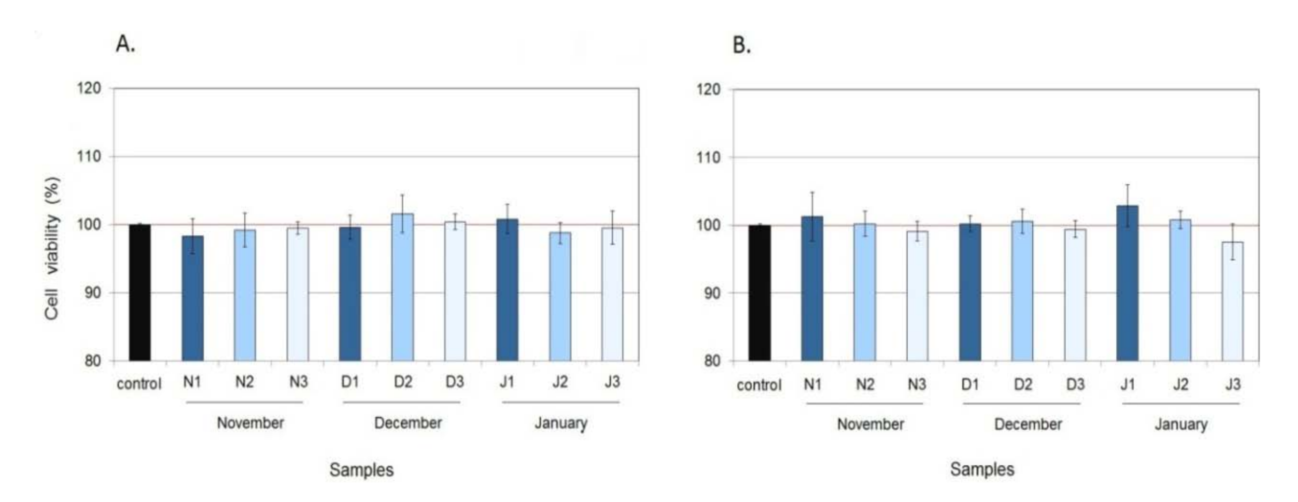


Figure 61 : Taux de viabilité de cellule mammaires MCF-7 exposées 24 h [A] et 72 h [B] à différents échantillons (1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée de STEP, (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs. Les résultats sont exprimés en moyennes et sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) ; @ différence significative (P<0,01) entre les échantillons prélevés le même mois ; (a) différence significative (p<0,01) entre les périodes de prélèvement.

IV. Analyse du potentiel perturbateur endocrinien sur les récepteurs œstrogéniques hERα et androgéniques hAR (test YES/YAS)

Des cultures de levures de *Saccharomyces cerevisiae* ont été exposées 48 h à des échantillons d'effluents hospitaliers et d'effluents d'entrée et sortie de STEP pour évaluer leur potentiel perturbateur endocrinien. Les valeurs sont les moyennes de 4 points de mesure (2 séries en duplicata).

III.1. Potentiel agoniste/antagoniste sur les récepteurs œstrogéniques hERα (YES)

Les résultats de l'analyse du potentiel œstrogénique des échantillons est présenté figure 62. L'activation des récepteurs humain hERα (effet agoniste) est multipliée par 3 avec l'échantillon des effluents hospitaliers prélevés au mois de Novembre (N1) (figure 62.A) et du mois de Janvier (J1) (figure 62.C). Les effluents d'entrée de STEP du mois de Janvier (J2) entrainent une induction de 2,5 fois (p<0,05) plus importante que la condition contrôle de référence. Il est à noter que bien que le taux d'induction des récepteur hERα induit par l'échantillon « J3 » (figure 62.C) soit légèrement supérieur à 1, il n'est cependant pas significatif. Aucun des échantillons prélevés au mois de décembre (figure 62.B) n'a d'effet agoniste.

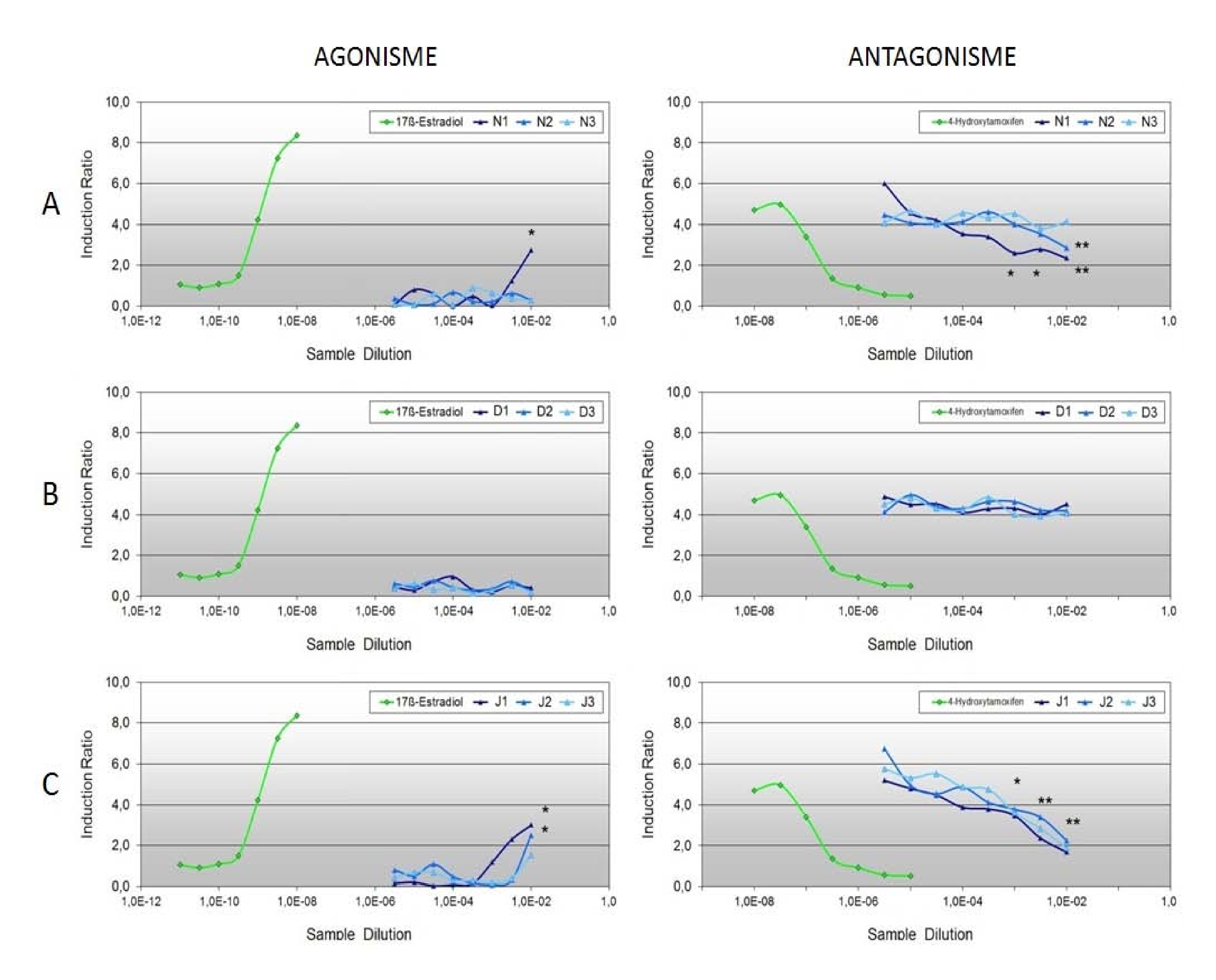


Figure 62: Evaluation du potentiel agoniste et antagoniste sur les récepteurs œstrogéniques (YES) de levures *S. cerevisiae* exposées à différents échantillons (1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée de STEP, (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs : (A) Novembre, (B) Décembre, (C) Janvier. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes. Les différences sont considérées significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

En ce qui concerne l'inhition de l'activité des récepteurs œstrogéniques (effet antagoniste), aucun échantillon prélevé au mois de décembre n'entraine un effet. Par contre les effluents hospitaliers ainsi que ceux d'entrée de STEP du mois de Novembre (N1, N2) inhibent quasiment d'un facteur 2 (p<0,01) l'activité des récepteurs. De plus, on constate que l'échantillon « N1 » et « N2 » conservent leurs effets antagonistes jusqu'à des facteurs de dilution de 10^{-3} (p<0,05) et 3.10^{-2} (p<0,05), respectivement. Ces résultats mettent en évidence un caractère toxique important de ces échantillons, même à de très faibles concentrations.

Indépendamment du lieu de prélèvement, les échantillons du mois de Janvier induisent une inhibition significative de l'activité des récepteurs œstrogéniques. Les effluents hospitaliers (J1) inhibent d'un facteur 2 (p<0,01) à 1,5 (p<0,05) l'activité des récepteurs, pour des dilutions allant respectivement jusqu'à 3.10^{-2} et 10^{-3}. Concernant les effluents d'entrée et de sortie de STEP, les résultats sont

quasiment identiques et se caractérisent par un antagonisme d'un facteur 2 à 1,5 ($p<0{,}01$) pour des dilutions respective de 10^{-2} et 3.10^{-2}.

III.2. Potentiel agoniste/antagoniste sur les récepteurs androgéniques hAR (YAS)

L'effet perturbateur androgénique est présenté figure 63. Un tiers des échantillons (3/9) ont un effet agoniste. L'exposition des levures aux effluents hospitaliers entraine un effet agoniste significatif seulement pour le mois de Janvier (J1), avec un taux d'induction 5 fois plus important que la condition normale de référence (figure 63.C).

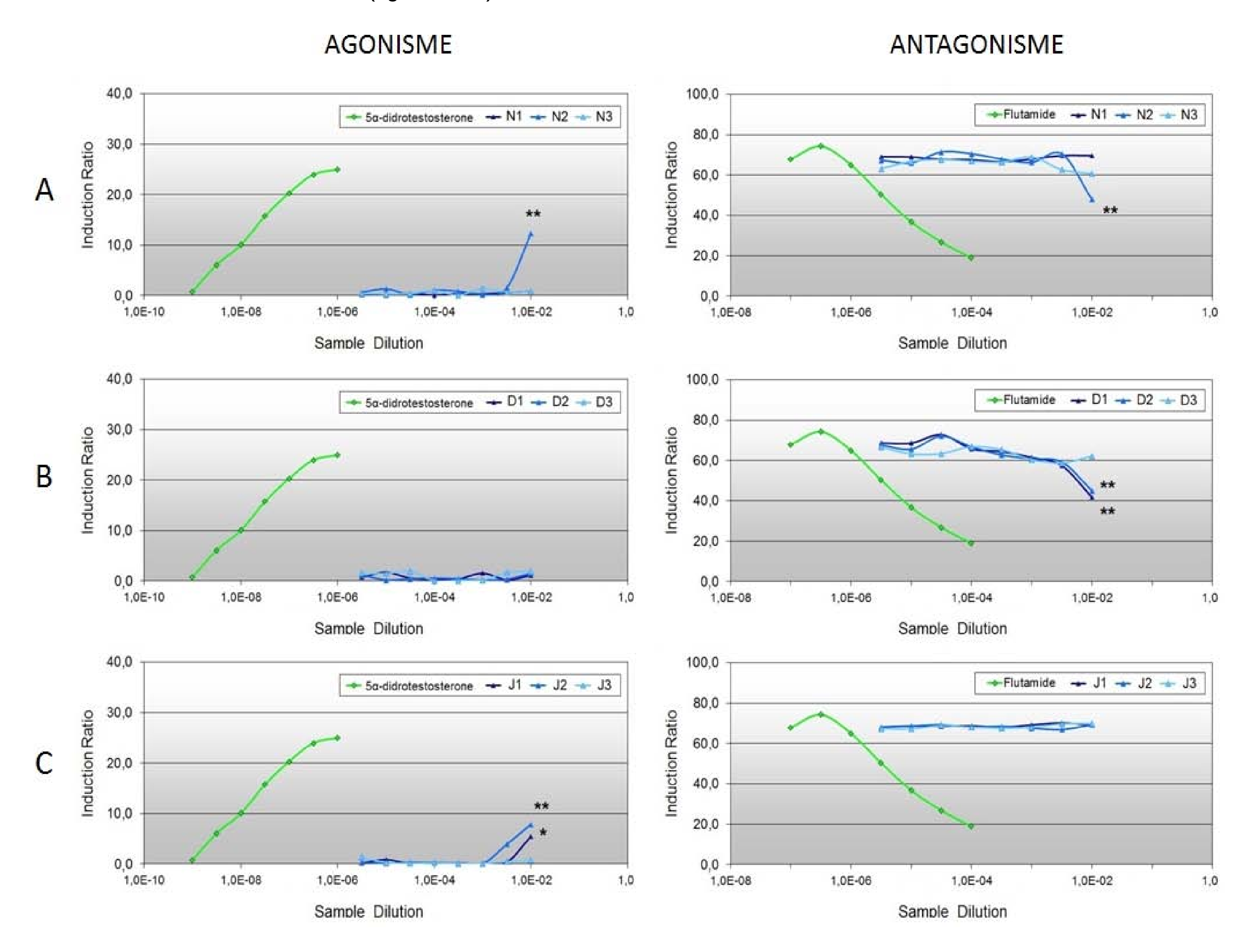


Figure 63 : Evaluation du potentiel agoniste et antagoniste sur les récepteurs androgéniques (YAS) de levures *S. cerevisiae* exposées différents échantillons (1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée de STEP, (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs : (A) Novembre, (B) Décembre, (C) Janvier. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes et sont considérées statistiquement significatives à $p<0{,}05$ (*) et $p<0{,}01$ (**).

L'exposition à l'effluents d'entrée de STEP prélevé au mois de Novembre (N2) (figure 63.A) induit une activation des récepteur hAR douze fois plus importante ($p<0{,}01$) que la condition normale de référence et celui du mois de janvier (J2) induit une suractivité des récepteurs d'un taux 10 fois plus important ($p<0{,}01$) (figure 63.C). Aucun effet agoniste n'a été mesuré pour l'ensemble des

échantillons issus des effluents en sortie de STEP, ni pour les échantillons prélevés au mois de décembre (figure 63.B).

Pour ce qui est de l'évaluation du potentiel antagoniste des récepteurs aux androgènes, on constate là aussi qu'un tiers induit des effets de toxicité. Aucun des prélèvements effectués au mois de janvier n'a un effet antagoniste (figure 62.C). Par contre les effluents en entrée de STEP prélevés en novembre (N2) et en décembre (D2) entrainent un effet antagoniste important, en inhibant approximativement de 20 fois (p<0,01) l'activité. Concernant les effluents hospitaliers, seul le mois de Décembre induit des effets toxiques (p<0,01) se traduisant par un effet antagoniste très marqué sur les récepteurs hAR. De plus, on peut noter que la courbe est superposable à celle des effluents en entrée de STEP (figure 63.B).

V. Analyse des cassures à l'ADN sur cellules humaines (test des comètes).

Les cellules humaines hépatiques (HepG2) et de glandes mammaires (MCF-7) ont été exposées pendant 24 h à 72 h aux différents échantillons d'effluents hospitaliers et d'effluents d'entrée et sortie de STEP. Les valeurs sont exprimées en moyenne de 6 points de mesures (3 séries en duplicata).

V.1. Analyse des cassures à l'ADN sur cellules hépatiques (HepG2)

On constate que deux tiers des échntillons induisent après 24 h d'exposition des cassures à l'ADN (figure 64). Indépendamment de la période de prélèvement, tous les effluents hospitaliers (N1, D1 et J1) induisent un taux significatif de cassures à l'ADN (p<0,01 ; p<0,05) compris entre 5 % et 12 %. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les différents mois de prélèvements.

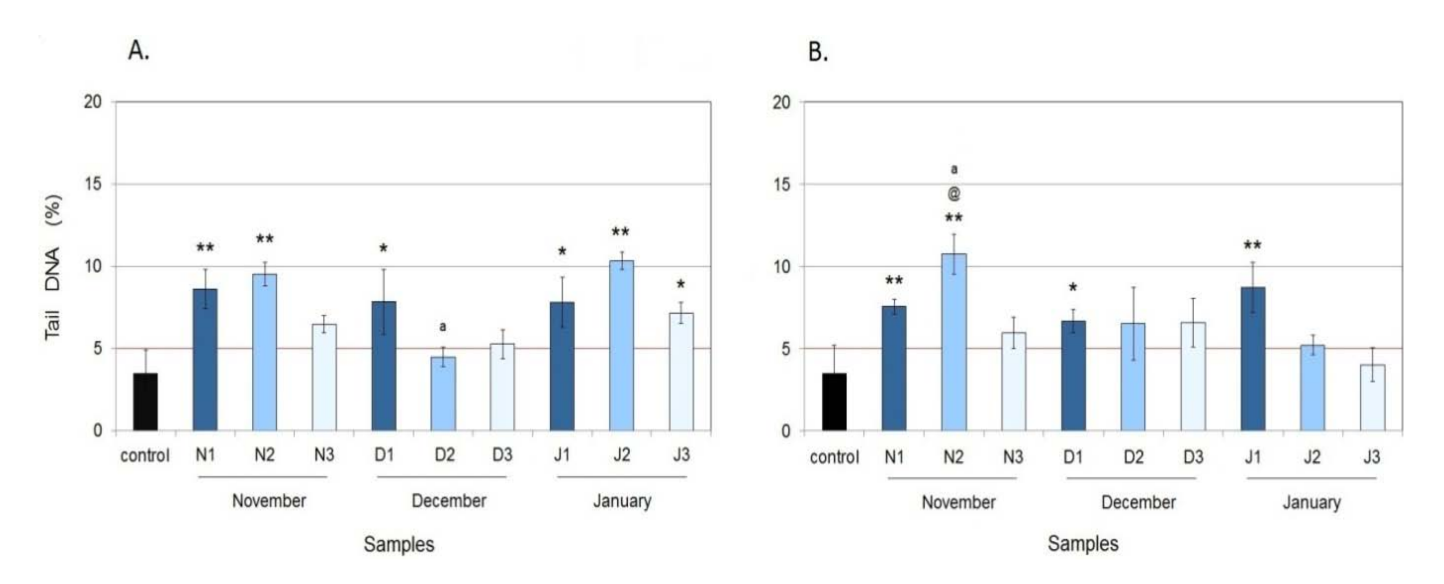


Figure 64 : Taux de cassures à l'ADN induites sur des cellules hépatique HepG2 exposées 24 h et 72 h à différents échantillons (1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée de STEP, (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs. Les résultats sont exprimés en moyennes et sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) ; @ différence significative (P<0,01) entre les échantillons prélevés le même mois ; (a) différence significative (p<0,01) entre les périodes de prélèvement.

Concernant la toxicité des effluents en entrée de STEP à 24 h, les échantillons du mois de Novembre (N2) et Janvier (J2) induisent des cassures à l'ADN (figure 64.A). Le taux de cassures avoisine 10 % et aucune différence significative n'est mesurée entre les échantillons. Le taux de cassures est significativement différent (p<0,05) de ceux obtenus avec les effluents hospitaliers et ceux de sortie de STEP. Pour ce qui est des prélèvements d'eaux en sortie de STEP, seul l'échantillon du mois de Janvier induit significativement (p<0 ,05) des cassures à l'ADN. Le taux de cassure est significativement différent (p<0,05) de celui des effluents en entrée de STEP, mais il est quasiment identique comparé aux effluents hospitaliers.

Après 72 h d'exposition (figure 64.B), les effluents hospitaliers « N1 » et « D1 » induisent toujours significativement des cassures à l'ADN mais à des taux légèrement plus faibles que ceux observés à 24 h. L'échantillon du mois de Janvier (J1) induit une génotoxicité un peu plus importante à 72 h d'exposition qu'à 24 h. C'est le cas également de l'échantillon N2 (entrée de STEP). Après 72 h d'exposition plus aucun des échantillons issus des eaux en sortie de STEP (N3, D3, J3) n'induit de cassure de l'ADN sur les cellules HepG2.

V.2. Analyse des cassures à l'ADN sur cellules mammaires (MCF-7)

Les cellules humaines mammaires (MCF-7) ont été exposées pendant 24 h à 72 h à différents échantillons d'eaux usées ou traitées. L'évaluation des cassures à l'ADN sont présentés dans la figure 65. Les valeurs sont exprimées en moyenne de 6 points de mesures (3 séries en double). On constate que l'exposition des cellules n'entraine jamais la formation de cassure à l'ADN quel que soit le temps d'exposition et quel que soit le prélèvement.

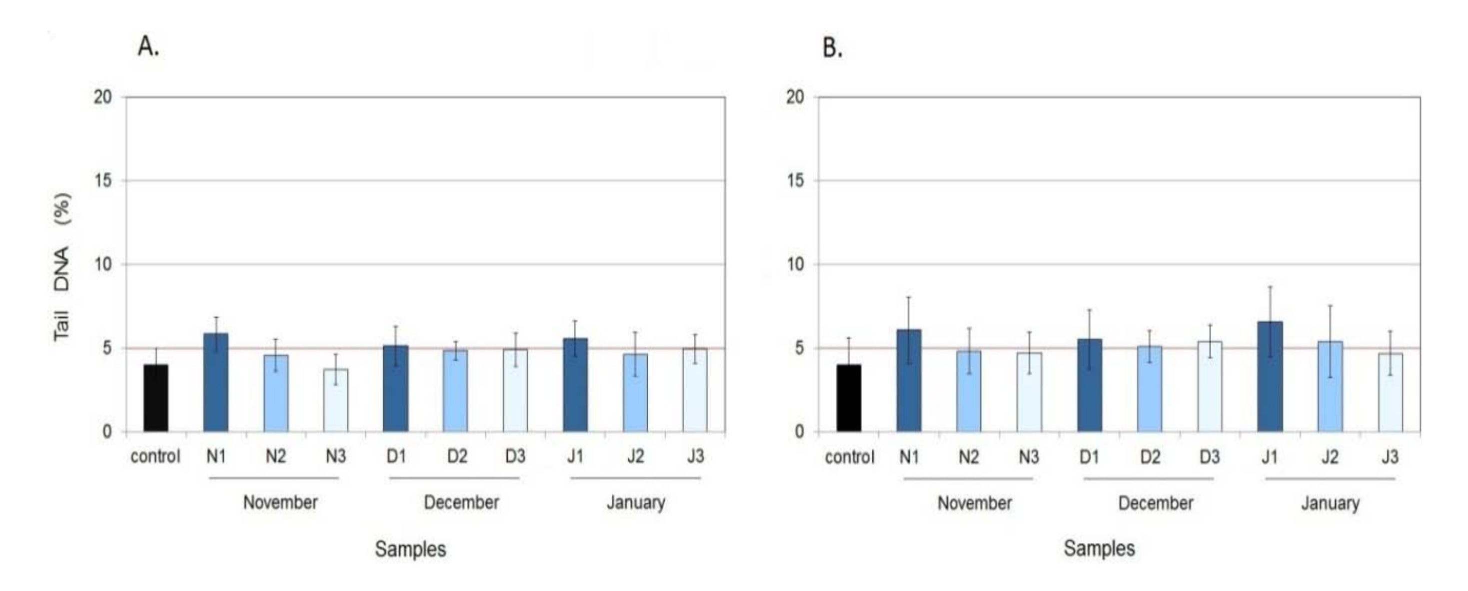


Figure 65 : Taux de cassures à l'ADN induites sur les cellules mammaires MCF-7 exposées 24 h [A] et 72 h [B] à différents échantillons (1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée deSTEP, (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs. Les résultats sont exprimés en moyennes et sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**).

VI. Analyse de la formation d'adduits à l'ADN sur cellules humaines (technique du post-marquage au ^{32}P)

VI.1. Analyse des adduits à l'ADN formés sur les cellules hépatiques (HepG2)

L'exposition des cellules HePG2 aux différents effluents entraine la formation de plusieurs adduits à l'ADN. Les valeurs sont exprimées en moyenne de 4 points de mesures (2 séries en double). Un exemple de profil est présenté dans la figure 66. Cinq à dix adduits sont formés (numérotés #1 à #10) en fonction du type d'échantillon testé.

De manière quantitative, on observe que les effluents hospitaliers atteignent un nombre total d'adduits supérieur à 150 adduits/10^9 nucléotides ($p<0,01$), indépendamment du mois de prélèvement (figure 67). De plus, on note que l'échantillon du mois de Novembre (N1) induit une génotoxicité significativement plus importante ($p<0,05$) que les deux autres mois (D1, J1).

Concernant les échantillons d'eaux en entrée de STEP, le taux d'adduits dépasse 200 adduits/ 10^9 nucléotides quelle que soit la période (N2, D2 et J2). La génotoxicité de l'échantillon « N2 » est significativement plus importante comparée à celle de l'échantillon « D2 ». Bien que supérieur à 300 adduits/10^9 nucléotides ce taux ne diffère pas statistiquement de l'échantillon « J2 ». Dans le cas des effluents en sortie de STEP (N3, D3, J3) on observe un abattement de la toxicité par rapport aux autres types d'effluents analysés. Le nombre d'adduits pour l'échantillon « N3 » est significativement différents de « D3 » et « J3 ».

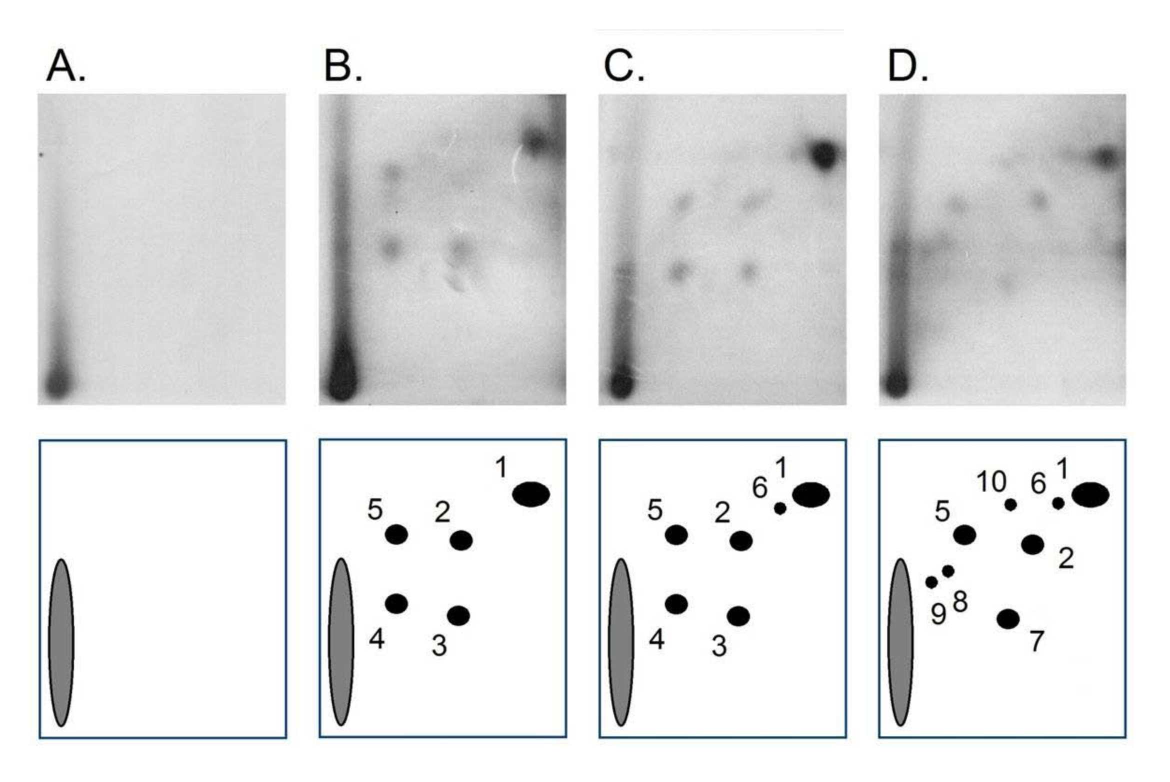


Figure 66 : Exemple de profils d'adduit à d'ADN (4 µg) de cellules hépatique (HepG2) exposées à : (A) eau ultra pure, (B) effluents hospitaliers, (C) effluents d'entrée de STEP, (D) eaux en sortie de STEP.

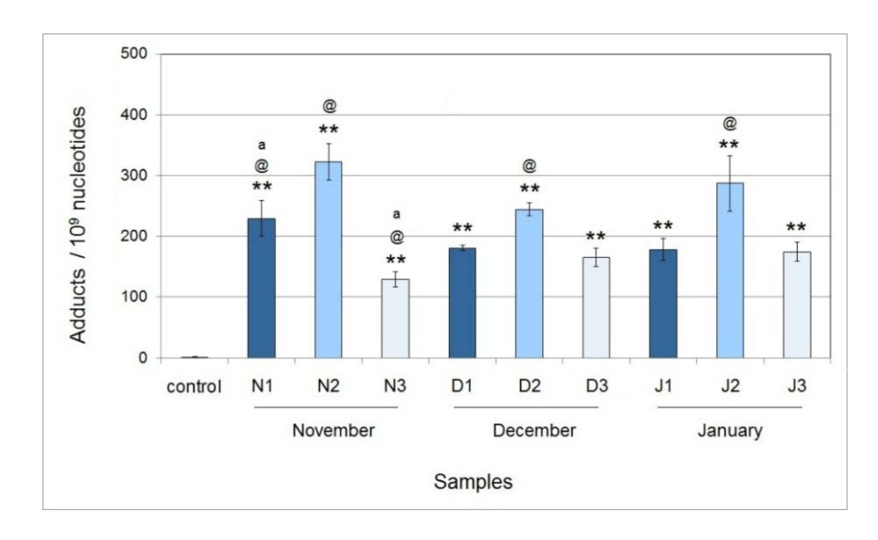


Figure 67 : Nombre d'adduits à l'ADN formés par 10^9 nucléotides dans des cellules hépatiques (HepG2) exposées 24 h à différents échantillons(1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée de STEP, (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs. Les résultats sont exprimés en moyennes et sont considérées statistiquement significatifs à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) ; @ différence significative (P<0,01) entre les échantillons prélevés le même mois ; (a) différence significative (p<0,01) entre les périodes de prélèvement.

L'évolution de la génotoxicité entre la sortie d'hôpital et la sortie de STEP est comparable pour chaque mois de prélèvement : une augmentation (p<0,01) de la toxicité depuis l'hôpital jusqu'à la station d'épuration, puis un abattement de celle-ci après traitement biologique.

VI.2. Analyse des adduits à l'ADN formés sur les cellules mammaires (MCF-7)

Tout comme pour les cellules hépatiques, l'analyse des résultats mettent en évidence la formation à 24 h de plusieurs adduits à l'ADN sur les cellules mammaires (MCF-7), et ce quel que soit le lieu de prélèvement (figure 68).

Les adduits #1 et #2 formés sur les cellules HepG2 sont formés majoritairement sur les cellules MCF-7 après exposition aux effluents hospitaliers ainsi qu'aux effluents d'entrée et de sortie de STEP. L'adduit #6 qui avait été observé suite à l'exposition des cellules HepG2 aux effluents d'entrée et sortie de STEP est également formé dans les cellules MCF-7 exposées uniquement aux effluents en sortie de STEP. Néanmoins, les profils d'adduits sont qualitativement différents entre eux et présentent des adduits différents de ceux formés dans les cellules hépatiques (vs figure 66). On constate notamment la formation des adduits #11 et #12 lors d'une exposition des cellules aux effluents hospitaliers, de adduit #13 avec les effluents en entrée de STEP, et des adduits #14 et #15 avec les effluents en sortie de STEP.

L'analyse quantitative des résultats met en évidence l'apparition d'une génotoxicité à 24 h, indépendamment du lieu et de la période de prélèvement. Chaque période est significativement différente (p<0,01) des deux autres (figure 69).

En comparant les périodes de prélèvement, on constate notamment que les effluents hospitaliers des mois de Novembre (N1) et Décembre (D1) induisent la formation d'un nombre total d'adduits compris entre 150 et 200 adduits/10^9 nucléotides (p<0,01), alors que l'échantillon du mois de Janvier (J1) en induit environ le double (400 adduits/10^9 nucléotides).

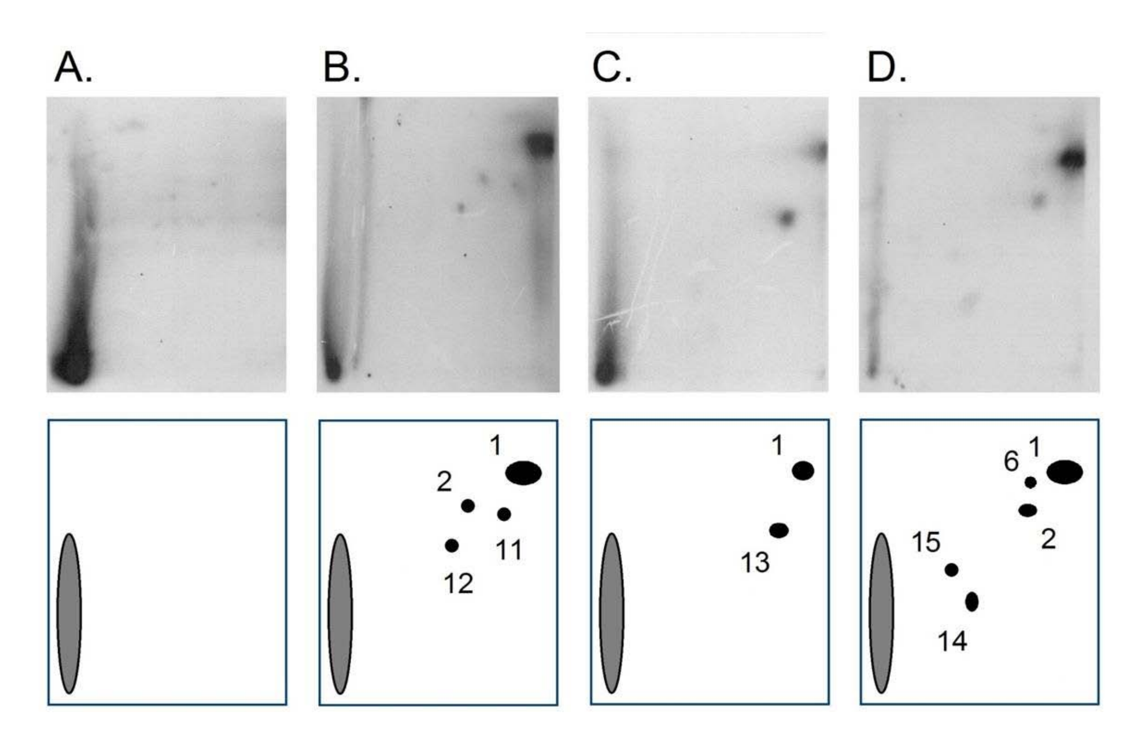


Figure 68 : Exemple de profils d'adduits à l'ADN de cellules mammaires (MCF-7) exposées à: (A) eau ultra pure, (B) effluents hospitaliers, (C) effluents d'entrée de STEP, (D) eaux en sortie de STEP.

Les échantillons d'effluents en entrée de STEP (N2, D2, J2) induisent significativement (p<0,01) moins d'adduits à l'ADN que ceux des effluents hospitaliers. Comme précédemment, la réponse induite par chaque échantillon est significativement différente des deux autres. Concernant les eaux en sortie de STEP (N3, D3, J3), on constate un abattement important de la génotoxicité indépendamment de la période de prélèvement. Les taux totaux d'adduits sont nettement inférieurs à 100 adduits/10^9 nucléotides. L'échantillon du mois de Décembre (D3) en sortie de STEP est celui qui induit le moins d'adduits.

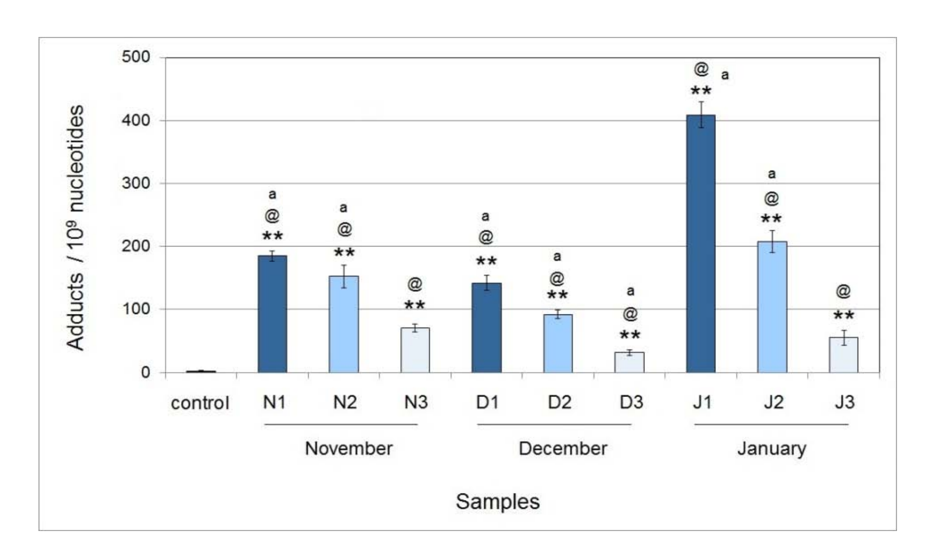


Figure 69 : Nombred'adduits à l'ADN par 10^9 nucléotides dans les cellules de glandes mammaires (MCF-7) exposées 24 h à différents échantillons (1) d'effluents hospitalier, (2) d'effluents en entrée de STEP, (3) d'eaux en sortie de STEP prélevés pendant 3 mois consécutifs. Les résultats sont exprimés en moyennes et sont considérées statistiquement significatives à p<0,05 (*) et p<0,01 (**) ; @ différence significative (P<0,01) entre les échantillons prélevés le même mois ; (a) différence significative (p<0,01) entre les périodes de prélèvement.

De manière globale, on observe une tendance identique pour chaque mois de prélèvement, avec une diminution importante ($p<0,01$) de la toxicité depuis l'hôpital jusqu'à la sortie des eaux de la station d'épuration. On peut également observer que le mois de Janvier induit la formation du plus grand nombre d'adduits, tandis que le mois de Décembre semble être le moins génotoxique.

DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons appliqué les tests retenus dans l'étude de la toxicité de molécules modèles. Cette batterie de test a permis de mettre en évidence plusieurs réponses de toxicité aiguë et chronique. La synthèse des résultats est présentée dans les tableaux 19 et 20.

Au cours de cette analyse *in situ*, nous avons constaté que tous les tests, à l'exception de la viabilité cellulaire et la formation des cassures à l'ADN sur cellules MCF-7, permettent de distinguer soit les périodes de prélèvements, soit les lieux de prélèvements. L'interprétation peut sembler complexe car les réponses ne sont pas identiques. Il faut néanmoins garder en tête que les différents tests ne donnent pas les mêmes informations.

On notera cependant que même si tous les effluents induisent des effets toxiques significatifs voire très significatifs selon les essais, il n'a pas toujours été possible de déceler des différences entre les périodes de prélèvement, ou encore de valider un abattement de la toxicité après le retraitement en STEP.

Le profil d'inhibition de la croissance algale (Algaltox F™) est identique quelle que soit la période de prélèvement. Par contre la toxicité disparait après la STEP avec une inversion de la toxicité puisqu'on observe une prolifération cellulaire.

Avec les autres tests on constate une différence significative entre les différentes périodes.

Dans le test d'inhibition de la croissance bactérienne (Microtox®), l'étude de la viabilité cellulaire hépatique et la formation des adduits à l'ADN dans les cellules des glandes mammaires (MCF-7), l'effet toxique était plus important au mois de janvier comparé aux autres mois de prélèvements.

Pour d'autres tests comme les cassures à l'ADN des cellules hépatiques et les tests YES/YAS on note une différence significative entre le mois de décembre et les deux autres mois de prélèvement.

Il est important de noter que quel que soit le test, il y a toujours un abattement de la toxicité dans les échantillons prélevés après la STEP.

		TESTS DE VIABILITE					
		Microtox® *(toxicité aiguë)*	**Algaltox F™** *(toxicité chronique)*	**Viabilité cellulaire (MTS)** *(toxicité aiguë et chronique)*			
				Hépatique (HepG2)		Mammaire (MCF-7)	
		30 '	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
NOVEMBRE	**1**	Prolifération	Inhibition	0	0	0	0
	2			0	Prolifération	0	0
	3		Prolifération	0	0	0	0
DECEMBRE	**1**	Prolifération	Inhibition	0	0	0	0
	2			0	0	0	0
	3		Prolifération	0	0	0	0
JANVIER	**1**	Inhibition	Inhibition	0	0	0	0
	2			Prolifération	0	0	0
	3	Prolifération	Prolifération	0	Inhibition	0	0
Commentaires		Le phénomène de prolifération est révélé par l'induction importante de la bioluminescence bactérienne	Les taux d'inhibition mesurés sont tous supérieurs à 90 %.	-			

Tableau 19 : Comparaison des résultats obtenus *via* l'utilisation de bioessais reflétant les effets aigus (viabilité bactérienne et cellulaire humaine) et chroniques (inhibition de la croissance algale et lenticulaire) ; 0 aucune toxicité n'a été observée.

		BIOMARQUEURS DE GENOTOXICITE							
		Test YES/YAS		Test des comètes				Post-marquage des adduits au ^{32}P	
		Récepteur hER-α (œstrogénique)	Récepteur hAR (androgénique)	Cell. Hépatique (HepG2)		Cell. Mammaire (MCF-7)		Cell. Hépatique (HepG2)	Cell. Mammaire (MCF-7)
		48 h		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	24 h
NOVEMBRE	1	Agoniste / Antagoniste	0	Cassures à l'ADN	Cassures à l'ADN	0	0	Adduits à l'ADN	Adduits à l'ADN
	2	Antagoniste	Agoniste / Antagoniste			0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		
DECEMBRE	1	0	Antagoniste	Cassures à l'ADN	Cassures à l'ADN	0	0	Adduits à l'ADN	Adduits à l'ADN
	2	0	Antagoniste	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		
JANVIER	1	Agoniste / Antagoniste	0	Cassures à l'ADN	Cassures à l'ADN	0	0	Adduits à l'ADN	Adduits à l'ADN
	2	Agoniste / Antagoniste	0		0	0	0		
	3	Antagoniste	0		0	0	0		
Commentaires		-		Bien que des cassures à l'ADN soient détectées sur les cellules hépatiques, les taux restent faibles et compris entre 5 et 12 %.				Le nombre d'adduits formés est globalement plus important sur les cellules hépatiques, sauf cas particulier des effluents hospitalier du mois de Janvier (J1) qui induisent 2 fois plus d'adduits sur cellules MCF-7 que les cellules HepG2.	

Tableau 20 : Comparaison des résultats obtenus *via* l'utilisation de biomarqueurs de génotoxicité reflétant les effets aigus (comètes, post-marquage) et chroniques (comet, YES/YAS) ; 0 : aucune toxicité n'a été observée.

De manière générale, il est intéressant de souligner que la toxicité globale des effluents (hôpital, entrée et sortie de STEP) du mois de décembre est au moins égale (ou très légèrement inférieure) à celle du mois de novembre et janvier. On aurait pu penser qu'au cours de cette période où il y une baisse des traitements chimiothérapeutiques, la toxicité serait plus faible. L'étude menée par Ferrando *et al*. (2013) sur l'analyse chimique des contaminants dans l'eau avait d'ailleurs confirmé la diminution de la concentration des médicaments en décembre. L'étude a aussi montré un abattement des concentrations des médicaments depuis les effluents hospitaliers jusqu'aux effluents de sortie de STEP (tableau 18), sauf le docetaxel qui se concentre en entrée de STEP quelle que soit la période avant d'être épuré ou le méthotrexate qui se concentre en STEP au mois de Décembre.

Par comparaison avec notre étude, ces résultats laissent penser que d'autres types de contaminants rejetés au mois de décembre sont impliqués dans les effets biologiques observés, puisque les concentrations en médicaments détectés pendant cette période sont les plus faibles comparées aux mois de novembre et janvier. Cependant aucune analyse chimique n'a été faite pour déterminer la nature et la concentration des d'autres polluants ou des métabolites qui pourraient être à l'origine des effets observés, notamment les produits détergeants.

L'utilisation en parallèle de biomarqueurs de génotoxicité lors de l'étude vient confirmer ces observations, puisqu'on ne constate pas non plus de différence de réponse en fonction du lieu de prélèvement ou de la période de prélèvement des échantillons (tableau 19). Par exemple, le test YES/YAS ou encore le test des comètes ne permettent pas de détecter systématiquement des effets endocriniens et/ou génotoxiques. Par contre, la détection des adduits encombrants par la technique de post-marquage est beaucoup plus sensible. Ainsi, le test des comètes réalisé sur les cellules mammaires MCF-7 ne permet pas de visualiser des cassures à l'ADN alors que des adduits sont formés.

Par ailleurs, même si les mécanismes de génotoxicité détectés sont intrinsèquement différents entre les tests YES/YAS, le test des comètes sur cellules hépatiques, ou encore la technique de post-marquage sur les deux lignées cellulaires, ils permettent de détecter simultanément la génotoxicité d'un même échantillon analysé.

Dans certains cas seul le marquage des adduits permet de caractériser la toxicité de l'effluent. Le fait de ne pas trouver en parallèle de cassures peut être dû au fait que le temps d'exposition pour la détermination des cassures n'est pas adéquate : soit trop long pour visualiser les cassures provoquées par un stress oxydatif ; soit trop court pour visualiser les effets de réparation des lésions.

Concernant plus particulièrement le test YES/YAS, on observe que l'essai est plutôt sensible de par les taux de toxicité enregistré et le nombre d'échantillons révélés génotoxiques. Indépendamment de la date ou du lieu de prélèvement, les activités agonistes ou antagonistes des récepteurs aux œstrogènes (hERα) ou aux androgènes (hAR) sont détectées jusqu'à des dilutions de 10^{-3}. Cependant, il est important de souligner que les effluent ne sont pas toujours agonistes et antagonistes à la fois, et qu'ils n'interagissent pas forcément non plus sur les deux types de récepteurs en même temps. C'est le cas par exemple avec les effluents hospitaliers qui n'induisent

pas de toxicité en Novembre (N1), induit un antagonisme en Décembre (D1), alors qu'on observe un effet agoniste en Janvier (J1). A l'inverse, les effluents de sortie de STEP (N3, D3 et J3) n'ont aucun effet perturbateur androgénique, indépendamment de la période de prélèvement. Bien que ce test mette en évidence des activitées de perturbation endocrienne de certains effluents, il est important de souligner que les résultats sont très difficiles à interpréter et qu'ils ne permettent de suivre concrètement un abattement de la toxicité. L'analyse faite ici ne permet pas en l'état actuel de conclure sur un risque potentiel vis-à-vis d'organismes qui pourraient être exposés à long terme à de tels polluants. Pour ce qui est du test des comètes, les taux de cassures les plus importants n'excèdent pas 12 %, mais on néanmoins on observe un abattement de la toxicité depuis les effluents en entrée de STEP, jusqu'à leur rejet dans l'environnement. On observe également une diminution de la génotoxicité au niveau des cellules hépatiques à 72 h, qui peut s'expliquer par la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN.

La détection des adduits encombrants par la technique de post-marquage apparait clairement comme l'outil le plus sensible de la batterie de test. L'utilisation de ce biomarqueur dans l'analyse de la génotoxicité des effluents a permis de révéler pour chaque échantillon la présence importante d'adduits à l'ADN. On note aussi que le nombre d'adduits détectés (en valeur absolue) est plus important pour les cellules hépatiques comparé aux cellules mammaires. De manière qualitative, dix adduits sont détectés dans les cellules hépatiques, alors que seulement cinq sont formés sur les cellules mammaires. Parmi ces adduits, trois d'entre eux (#1, #2 et #6) sont retrouvés dans les deux types de lignées cellulaires.

Par ailleurs, on peut observer que pour les cellules hépatiques la génotoxicité induite par les échantillons en entrée de STEP (N2, D2 et J2) est toujours la plus importante que tous les autres effluents. L'augmentation de la génotoxicité entre les effluents hospitaliers et les effluents en entrée de STEP pourrait s'expliquer par un phénomène de conjugaison-déconjugaison des molécules chimiques dans les effluents en entrée de STEP, mais également par une concentration des contaminants *via* les rejets domestiques urbains. On constate également qu'il y a un abattement de la toxicité en sortie de STEP, indépendamment de la période de prélèvement.

Pour les cellules mammaires, c'est au contraire les effluents hospitaliers (N1, D1 et J1) qui induisent la plus forte génotoxicité. De plus, on observe un abattement de la toxicité depuis les rejets hospitaliers jusqu'à la sortie de STEP, quelle que soit la période de prélèvement.

Quelle que soit la lignée cellulaire, on note que les échantillons du mois de décembre sont toujours les moins génotoxiques. Ce résultats est identique pour le test YES/YAS et le test des comètes.
Il est intéressant de souligner que la différence de réponse de génotoxicité observée entre les lignées cellulaires confirme le rôle prépondérant de la métabolisation dans l'induction d'une toxicité. On constate notamment que les cellules hépatiques permettent de détecter le plus souvent l'apparition de cette toxicité, indiquant que les responsables sont sans doute les métabolites, non pris en compte à l'heure actuelle dans les analyses. Ces différences ont déjà été observées lors de l'utilisation du test MTS et du test des comètes, les cellules mammaires n'ayant pas permis d'évaluer la toxicité des effluents testés. Cela avait aussi été remarqué avec ces mêmes tests lors de l'analyse de la toxicité

de molécules pures dans la partie 1 des résultats. Cependant, l'utilisation de la lignée cellulaire mammaire à tout de même permis de révéler la formation d'adduits à l'ADN différents et complémentaires de ceux formés sur la lignée hépatique. Ce dernier point met en exergue l'importance d'utiliser les deux lignées cellulaires de manière complémentaire dans le cadre d'une analyse par post-marquage, afin d'affiner les profils de toxicité des effluents. De plus cette lignée cellulaire est la cellule modèle pour tester les molécules ayant des propriétés de perturbateur endocrinien.

L'ensemble des résultats présentés dans cette deuxième partie nous a permis de mettre évidence l'importance du choix des essais dans le cadre d'une analyse de la toxicité des rejets hospitaliers. La métabolisation des contaminants dans l'eau par les organismes exposés montrent clairement que les molécules ont des cibles et des modes d'action différents. Comme, les effets toxiques dépendent du temps d'exposition et des doses de médicaments dans les effluents, certains tests peuvent s'avérer négatifs alors que des substances toxiques sont bien présentent ; cette constatation jusitifie l'utilisation de plusieurs tests en parallèle.

Bien que l'on puisse admettre que l'absence d'effets révélés par un bioessai ou un biomarqueur au cours d'une analyse puisse tout simplement signifier que l'échantillon n'est pas toxique, on constate ici que dans certains cas les résultats peuvent apparaitre comme « faux-négatifs ». Cela confirme l'importance d'utiliser des batteries de tests d'(éco)toxicité dans l'évaluation du risque environnementale des rejets en général, mais souligne aussi et surtout l'importance d'y intégrer des biomarqueurs de génotoxicité. Ainsi, la batterie de tests utilisée ici est pertinente puisqu'elle nous a permis de caractériser globalement la toxicité des échantillons.

Toutefois, il est nécessaire de rappeler que les analyses physico-chimiques de ces effluents sont incomplètes, et qu'il est difficile de corréler la toxicité observée à la seule présence de molécules médicamenteuses dans les eaux usées. De plus, l'utilisation en parallèle des tests a montré que le profil de toxicité d'un échantillon n'était pas toujours le même selon les organismes. Les résultats présentés à ce stade ne permettent donc pas de conclure quant au risque environnemental lié aux rejets de médicaments anticancéreux dans les effluents. On notera cependant que le test Algaltox F™ laisse supposer qu'une prolifération des algues en sortie de STEP pourrait conduire à un phénomène d'eutrophisation, ou encore que la formation d'adduit à l'ADN pourrait entrainer des mutations plus moins grave chez les organismes exposés. Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour venir confirmer ces hypothèses.

Conclusions & Perspectives

L'émergence au XXe siècle d'une médecine technico-scientifique a permis à l'homme d'influer sur sa propre destinée en lui donnant les moyens, de maîtriser sa fécondité et les conditions de sa naissance, de modifier l'évolution spontanée de certaines maladies, et de retarder son trépas. La révolution génétique et le décryptage du génome entretiennent l'illusion de connaître l'homme en lui permettant de scruter le moindre recoin de son ADN, et engendre chez lui l'attente du « grand jour » où il deviendra ainsi totalement maître de sa destinée. Toutes ces évolutions se sont accompagnées d'une part d'avancées techniques et technologiques considérables, mais également d'une production et d'une utilisation toujours plus importante de composés chimiques incluant les médicaments. Même si les concentrations de ces contaminants environnementaux sont généralement faibles (de l'ordre du ng/L au µg/L) et en dessous des limites de détection des essais biologiques (Besse *et al*., 2012), le risque lié aux rejets liquides et notamment des services de santé suscitent chez les scientifiques un questionnement sur le risque environnemental pour la faune et la flore exposée à de telles polluants dans les milieux, mais aussi pour l'homme *via* les eaux de boisson. Le risque est d'autant plus préoccupant lorsque ces composés et leurs métabolites sont présents en mélange (Hernando *et al*., 2006 ; Zegura *et al*., 2009). De plus, la demande et la production d'eau potable ne pouvant pas être totalement satisfaite par les eaux souterraines, d'autres sources, telles que les eaux de surface, ont dû être aussi considérées.

Cette question environnementale occupe aujourd'hui une large place dans les préoccupations de la société. Une enquête commandée par le CNRS fin 1999 sur les attentes du public vis-à-vis de la science a permis de constater que le thème de la maladie venait en première position parmi les questions qui intéressaient le plus de personnes, et que les thèmes relatifs à l'environnement occupaient très largement la seconde place (Boy & cheveigné, 2000). Répondant à la demande sociétale, de nombreuses mesures législatives et règlementaires ont été adoptées, en particulier dans les pays développés, et des agences spécialisées ont été chargées d'en assurer la mise en œuvre ainsi que le suivi. Dans ce contexte, le rôle des scientifiques est de contribuer à répondre à la demande sociétale, en fournissant des outils pour pouvoir mettre en œuvre les lois et les règlements existants dans le cadre d'une ingénierie écologique, mais aussi en agissant en tant qu'expert dans les instances de gestion et de décision pour communiquer sur les évolutions scientifiques et techniques qui permettront d'améliorer les démarches visant à la protection des milieux naturels et de la santé de l'homme.

Au cours de cette étude, nous avons pu constater à partir du nombre important de données générées que la mise en place d'une batterie de tests nécessitait d'être réflechie et pertinente pour une bonne évaluation (éco)toxicologique. Ceci met en exergue l'importance du choix des essais d'étude, du temps d'exposition, et dans le cas des études *in situ* l'importance de la saison et du lieu de prélèvement d'échantillons bruts. Ces résultats nous ont permis de constater que l'utilisation de biomarqueurs de génotoxicité, tel que les adduits à l'ADN, représente des outils très pertinents et très sensibles en complémentarité des essais standardisés normalement utilisés. Bien qu'on oppose souvent les approches fondées sur l'évaluation du risque au niveau individuel considérées comme

moins valables que les approches au niveau supra-individuel (Dearfield *et al*., 2005), notre étude montre au contraire que les bioessais et les biomarqueurs devraient être utilisé de pair.

Les tests standards ont permis de fixer des seuils (concentrations) considérés comme « protecteur » pour les milieux, mais pourtant dans certains cas des effets délétères peuvent être observés à des doses bien inférieures. De ce fait, il serait important de développer cette démarche de définition de seuils mais pour ceux des biomarqueurs qui paraissent plus fortement lié à la santé des individus (notamment l'homme), voire des populations. Une fois validé, un indice de ce type serait particulièrement adéquat pour être inclus dans une démarche normative fonctionnelle, aisée à mettre en œuvre pour les gestionnaires de la qualité environnementale. Mais il n'en reste pas moins que lier les effets néfastes de la pollution dans des organismes sentinelles à leurs conséquences écologique reste un défi majeur dans l'évaluation des impacts et des risques pour une gestion intégrée de l'environnement. Il est en effet crucial de démontrer ce qui apparait comme « intuitivement évident » aux écotoxicologues afin de faire face à la critique de sur évaluation des risques (Grue *et al*., 2002).

La conclusion de nos travaux est bien évidemment que l'utilisation d'une batterie de tests est incontournable, mais qu'elle doit intégrer à la fois des bioessais visant différents niveaux trophiques de l'écosystème, et des biomarqueurs pouvant porter sur plusieurs modèles d'études dont des lignées cellulaires humaines, afin d'être la plus pertinente pour extrapoler les résultats à un risque envrionnemental. Ces biomarqueurs à vocation écologique que nous avons utilisé présentent des avancées conséquentes par rapport aux procédures entérinées par l'usage. Dans le domaine de la biosurveillance, ils peuvent être d'une grande utilité en révélant des altérations de la santé du milieu et de l'homme avant qu'il n'y ait des effets massifs au niveau de l'organisme, de la population ou encore des communautés. Ils ont donc vocation à contribuer à une démarche pronostique notamment dans le cas des mélanges, permettant des actions préventives, contrairement aux bioessais qui ne permettent qu'un diagnostic *a posteriori*.

Si l'analyse doit être restreinte au strict minimum, il est primordial de définir clairement les hypothèses de l'étude et si possible de caractériser succinctement en amont les effets toxiques potentiels, afin de choisir la lignée cellulaire (capacité de métabolisation, présence de récepteurs hormonaux, etc.).

Outre l'aspect écologique, cette étude *in situ* a permis de valider la pertinence de certains tests pour caractériser et suivre la toxicité globale d'un échantillons en fonction du lieu et de la période de prélèvement. Il faut souligner que l'utilisation de tels outils par des gestionnaires pourrait permettre de suivre l'abattement de la toxicité après retraitements des eaux en STEP et valider ainsi leur capacité épuratoire. En tenant compte des aspects pécuniers et d'applicabilité dans le cadre d'analyses de routine, le nombre des essais devra se limiter aux plus pertinents. Nos résultats suggèrent l'utilisation en batterie des tests Microtox®, Algaltox F™ et l'analyse des adduits à l'ADN, par la méthode du post-marquage, sur lignées cellulaires humaines en tant que biomarqueur de génotoxicité. Cette technique représente notamment un indicateur qualitatif et quantitatif de choix à la fois dans l'évaluation du risque et mais aussi dans l'évaluation des capacités d'épuration de STEP.

En effet, la génotoxicité est un indicateur sensible d'exposition à des facteurs de stress pouvant entrainer des modifications de la structure et du fonctionnement du génome. Même si le

dysfonctionnement cellulaire et tissulaire qui en résulte peut être à l'origine de perturbations physiologiques avec des répercussions au niveau populationnel (développement, reproduction) ou encore à l'origine d'un processus de cancérogénèse, ces effets n'affectent pas forcément la viabilité des organismes et de ce fait ils ne sont pas détectés par les tests standardisés comme nous avons pu le voir. Par exemple, le taux de viabilité cellulaire évalué dans notre étude avec le test MTS n'a pas révélé de toxicité sur les cellules humaines, alors que la technique de post-marquage a mis en évidence une forte génotoxicité. Des processus de réparation ou de récupération peuvent expliquer ces résultats et montrent que les analyses utilisant les outils standards actuellement recommandés peuvent être biaisées ; d'où la pertinence d'y associer des biomarqueurs de génotoxicité sensibles.

Perspectives

Le développement récent des techniques de biologie moléculaires a permis d'avancer dans la voie d'une meilleure interprétation des effets génotoxiques et de leurs conséquences. La caractérisation des séquences dont l'expression est modifiée limite encore la portée des résultats lorsque le génome des organismes étudié est peu connu. La situation est moins critique actuellement pour les poissons que pour les invertébrés aquatiques à l'exclusion de quelques espèces modèles et d'intérêt économique comme l'huître. Des modifications de l'expression génétique peuvent témoigner de l'induction de mécanismes de résistance et d'adaptation des populations exposées aux facteurs de stress environnementaux. Il est donc certain que l'écotoxicogénomique permettra sous peu de développer une approche basée sur l'étude de biomarqueurs génomiques, qui aideront à l'établissement des critères de qualité de l'environnement aquatique sur une base mécanistique.

Nos travaux peuvent encore largement être améliorés et des études complémentaires devraient être menées à court terme *via* une approche de toxicogénomique sur nos molécules modèles ainsi que sur des effluents bruts. La détermination du niveau d'expression de certains gènes CYP par exemple, ou l'évaluation de la méthylation de l'ADN par HPLC seraient des approches intéressantes. Ces techniques sensibles et reproductibles présentent l'avantage d'être rapide et peu contraignante dans la mise en place des expériences.

Mais les principales études complémentaires prévues pour la suite de l'étude concernent avant tout l'évaluation de la génotoxicité des molécules modèles et des effluents sur le modèle végétal *Lemna*. La détermination de la présence d'adduits à l'ADN sur les plantes permettrait de souligner le caractère polluant « commun » à la faune et la flore des médicaments dans l'eau, notamment en ce qui concerne la génotoxicité. De plus, ces plantes pourraient être placées comme organismes sentinnelles en sortie de STEP par exemple.

D'autre part, nous avons prévu d'étudier de nouveaux types de mélanges à l'aide de cette batterie de tests, qui tiendrait compte cette fois d'un plus large éventail de molécules en mélange. Du fait de la présence récurrente entre autre de molécules dites « marqueurs anthropiques », de psychotropes, de pesticide ou encore de drogues, on pourrait imaginer intégrer à notre mélange initial de médicaments d'autre molécules chimiques comme la caféine (marqueur anthropique), l'oxazepam (antidépresseur), le DDT (pesticide organochloré) ou encore si possible une drogue (cocaïne, etc.). Bien qu'un nombre

important de molécule en mélange puisse compliquer l'interprétation des résultats, il permettrait au moins d'évaluer les interactions se produisant en mélange entre ces différentes familles de composés chimiques.

Par la suite, notre batterie de tests aura pour objectif d'évaluer plus finement la pertinence et l'efficacité de remédiation de procédés prévus pour le prétraitement des effluents hospitaliers avant leur rejet dans le réseau urbain d'égouts. A ce titre, un bioréacteur à membrane est déjà placé sur le site de l'hôpital de Rangueil et des campagnes de prélèvements sont en cours (projet ANR, Panacee). Un tel procédé a pour but d'abattre la concentration des composés pharmaceutiques dans les effluents hospitaliers, afin de limiter les flux de contaminants pouvant altérer l'efficacité d'épuration de la STEP et contaminer l'environnement. Faute de temps, ils n'ont pas encore été analysés.

Bibliographie

A

Adam, C., Debayle, C., Carel, D., Cavalié, I., 2006. Les produits radiopharmaceutiques dans les effluents hospitaliers et domestiques. Environnement, Risques et Sante, 5 (4), pp. 254-260.

Aden, D.P., Reed, N.D., and Jutila, J.W., 1972. Reconstitution of the in vitro immune response of congenitally thymusless (nude) mice. Proceedings Of The Society For Experimental Biology And Medicine.Society For Experimental Biology And Medicine (New York, N.Y.), 140, 548-552.

Afsharian, P., Möllgard, Z.H., Xie, H., Kimby, E., Hassan, M., 2005. The effect of ciprofloxacin on cyclophosphamide pharmakocinetics in patients with non-Hodgkin lymphoma. European Journal of Haematology, 75(3), 206-211.

Aga, D.S., 2008.Fate of pharmaceuticals in the environmentand in water treatment systems.CRC Press, Boca Raton, FL.

Akcha, F., Vincent-Hubert, F., Pfohl-Leszkowicz, A., 2003.Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (Limanda limanda) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. Mutation Research, 534, 21-32.

Albukhari, A.A., Gashlan, H.M., El-Beshbishy, H.A., Nagy, A.A., Abdel-Naim, A.B., 2009.Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen-induced hepatotoxicity in rats. Food and Chemical Toxicology, 47, 1689–1695.

Allain, P., 2000. Les Médicaments. Ed. Pharmacoloie 3rd Ed. CdM.

Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A.,, Roig, B., Gonzalez, C., 2006. A “tool box” for biological and chemical monitoring requirements for European Union’s Water Framework Directive. Talanta, 69, 302-322.

Allwood, M.C, 2002. Parenteral nutrition formulation.Artificial nutrition support in clinical practice, 2001, 435-443.

Amat, A., Burgeot, T., Castegnaro, M.,Pfohl-Leszkowicz, A., 2006.DNA adducts in fish following an oil spill exposure. Environmental Chemistry Letter, 4, 93-99.

Amat, A., Burgeot, T., Castegnaro, M.,Pfohl-Leszkowicz, A., 2005.Genotoxic impact of ERIKA fuel (Fuel N°2) on fish liver (Soleasolea).Environmentalchemistry, green chemistry and pollutant in ecosystems. Eric Lichtfouse, Jan Scwhartzbauer, Didier Robert (eds), Springer verlags, Heidelberg, 743-756.

Amenu, D., 2014. Assessment of disinfectant and antibiotic resistant bacterian in hospital wastewater. World Journal of Life Sciences Research,1(1), 1 – 7.

Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D., 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 70, 2281-2285.

Anadon, A., Martinez-Larragna, M.R., Iturbe, J., Martinez, M.A., Diaz, M.J., Frejo, M.T., Martinez, M., 2001. Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens.Research in Veterinary Science, 71(2), 101-109.

Anandatheerthavarada, H.K., Addya, S., Dwivedi, R.S., Biswas, G., Mullick, J., and Avadhani, N.G., 1997. Localization of multiple forms of inducible cytochromes P450 in rat liver mitochondria: immunological characteristics and patterns of xenobiotic substrate metabolism. Archives Of Biochemistry And Biophysics, 339, 136-150.

Andreozzi, R., Caprio, V., Ciniglia, C., De Champdore, M., Lo Giudice, R., Marotta, R., Zuccato, E., 2004.Antibiotics in the environment: Occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. Environmental Science and Technology, 38(24), 6832-6838.

Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., Skinner, M.K., 2005.Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. Science, 308, 1466–1469.

Aranha, O., Wood, D.P., Sarkar, F.H., 2000. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. Clinical Cancer Research, 6, 891–900.

Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P.S., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J., 1990. Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 87, 4790-4793.

Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004.Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom.Science of Total Environment, 333(1-3), 167-184

Attrassi, B., Saghi, M., Flatau, G., 1993. Multirésistance bactérienne aux antibiotiques en milieu marin (côte atlantique, Maroc). Environmental Technology, 14, 1179–1186.

B

Baquero, F., Martínez, J.L., Cantón, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology, 19, 260–265.

Bartsch, H., Rojas, M., Alexandrov, K., Risch, A., 1998.Impact of adduct determination on the assessment of cancer susceptibility. Recent Results in Cancer Research, 154, 86–96.

Beaubien, A., Lapierre, L., Boucharde, A., Jolicoeur, C., 1986. A multispecies toxicity assessment rocedureu sing flow Microcalorimetry: Comparison with other toxicity evaluation methods.Toxicity Assessment: An International Quaterly, 2, 187- 200.

Belpaeme, K., Cooreman, K., Kirsch-Volders, M., 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. Mutation Research, 425, 167-184.

Besse, J.P., Garric, J., 2007. Médicaments à usage humain: risque d'exposition sur les milieux récepteurs - Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales. CEMAGREF, Agence de l'Eau RMC. Lyon: 241p.

Besse, J.P., Garric, J., 2008. Human pharmaceuticals in surface waters: Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. Toxicology Letter, 176(2),104-123.

Besse, J.P., Latour, J.F., Garric, J., 2012. Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? Environment international, 39(1), 73-86.

Black, J.J., Baumann, P.C., 1991. Carcinogens and cancers in freshwater fishes.Environmental health perspectives, 90, 27.

Blackman, G., Robertson-Cuninghame, R., 1955.Inter-relationships between light intensity, temperature, and thephysiological effects of 2: 4-dichlorophenoxyacetic acid onthe growth of Lemna minor.Journal of Experimental Botany, 6, 156-176.

Blaise, C., Couture, P., 1984. Détection à l'aide d'un bio-essai (Selenastrumcapricornutum) des répercussions d'un rejet minier sur l'environnement aquatique: toxicité ou enrichissement en substance essentielle? Hydrobiologia, 114, 39-50.

Bliefert, C., Perraud, R., 2001. Chimie de l'Environnement: Air, Eau, Sols, Déchets. Editions De Boeck Université,1, 496.

Blum, D.J.W., Speece, R.E., 1991.A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations.Research Journal of Water Pollution Control Federal, 63(3), 198-207.

Bocquené, G., Chantereau, S., Clérendeau, C., Beausir, E., Ménard, D., Raffin, B., Minier, C., Burgeot, T., Pfohl-Leszkowicz, A., Narbonne, J.F., 2004. Biological effects of the "Erika" oil spill on the common mussel (Mytilus edulis). Aquatic Leaving Resources, 17(3), 309-316.

Boddy, A.V., Yule, S.M., 2000.Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines.Clinicological Pharmacokinetic, 38, 291.

Bohnenstengel, F., Hofmann, U., Eichelbaum, M., Kroemer, H.K, 1996.Charactérization of the cytoochrome P450 involved in side-chain oxidation of cyclophosphamide in humans. European Journal of Clinical Pharmacology, 51, 297-301.

Boillot, C., 2008. Evaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Thèse. Vaulx-en-Velin : INSA de Lyon, SSEIU, 298p.

Bombail, V., Moggs, J. G., Orphanides, G., 2004. Perturbation of epigenetic status by toxicants.Toxicology Letters, 149, 51-58.

Bonnard, N., Brondeau, M.T., Jargot, D., Lafon, L., 2001. Fiche toxicologique n° 239 - L'acide peracétique. INRS. Paris: 5p.

Boocock, D.J., Brown, K., Gibbs, A.H., Sanchez, E., Turteltaub, K.W., White, I.N.H., 2002.Identification of human CYP forms involved in the activation of tamoxifen and irreversible binding to DNA. Carcinogenesis, 23, 1897–1901.

Borgert, C.J., Quill, T.F., McCarty, L.S., Mason, A.M., 2004. Can mode of action predict mixture toxicityfor risk assessment? Toxicology Applied in Pharmacology, 201, 85-96.

Borner, K., Höffken, G., Lode, H., Koeppe, P., Prinzing, C., Glatzelc, P., Wiley, R., Olschewski, P., Sievers, B., Reinitz., 1986. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in healthy volunteers after oral and intravenous administration.European Journal of Clinical Microbiology, 5(2), 179-186.

Boy,D., Cheveigné, S., 2000. Enquête : les attentes du public vis-à-vis de la science. Sabouter JF, Caro P, Chercher jour après jours, les aventuriers du savoir. Edition autrement, Paris, 202-214.

Boyer, B., Jouanneau, J., Tucker, G., Valles, A.M., Sastre, X., Moens, G., Thiery, J.P., 1999. La métastase cancéreuse. Medecine Sciences, 6, 442.

Brain, R.A, Solomon, K.R.,Brooks, B.W., 2009.Targets, Effects and Risks in Aquatic Plants Exposed to Veterinary Antibiotics. ACS symposium series, 1018, 169-189.

Brandt, S., Heller, H., Schuster, K.D., Grot, J., 2004. Tamoxifen induces suppression of cell viability and apoptosis in the human hepatoblastoma cell line HepG2 via down-regulation of telomerase activity. Liver international, 24, 46-54.

Brandt, S., Heller, H., Schuster, K.D., Grot, J., 2005.The tamoxifen-induced suppression of telomerase activity in the human hepatoblastoma cell line HepG2: a result of post-translational regulation. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 131, 120-128.

Breder, C.D., Dewitt, D.L., Kraig, R.P., 1995.Characterization of an inducible cyclooxygenase in rat brain. Journal of Comp Neurology,355, 296-415.

Brown, K., Heydon, R.T., Jukes, R., White, I.N., Martin, E.A., 1999. Further characterisation of the DNA adducts formed in rat liver after the administration of tamoxifen, N-desmethyltamoxifen or N,N-didesmethyltamoxifen. Carcinogenesis, 20, 2011-2016

Buser, H.R., Muller, M.D., Theobald, N., 1998.Occurrence of the Pharmaceutical Drug Clofibric Acid and the Herbicide Mecoprop in Various Swiss Lakes and in the North Sea.Environmental Science Technology, 32(1998), 188-192.

Bulich, A.A., 1979. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environment.Aquatic Toxicology.Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 98.

Bulich, A.A., 1986. Bioluminescenceassays. Toxicity Testing Using Microorganisms, 57-74.

Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R.M., Garcia de la Parra, L.M., Pfohl-Leszkowicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern mediterranean sea.Marine Ecology Program, 131, 125-141.

Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., Hartmann, A., 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. Mutation Research, 627, 31-35.

C

Cairns Jr., J., 1983. Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? Hydrobiologia, 100, 47-57.

Cairns Jr., J., 1986.The myth of the most sensitive species. BioScience, 36, 670-671.

Calabrese, E.J., 2013. Hormesis once marginalized, evidence now support hormesis as the most fundamental dose response. Mattson MP, Calabrese EJ, editors. Hormesis Springer Science Buisness Media.

Calabrese, E.J., Stanek, E.J., Nascarella, M.A., 2011. Evidence for hormesis in mutagenicity dose-response relationships. Mutatation Research, 726, 91–97.

Calabrese, E.J., 2005. Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) doses responses. Critical Review of Toxicology, 35, 463-582.

Callahan, M.A., Sexton, K., 2007. If cumulative risk assessment is the answer, what is the question? Environment Health Perspective, 115, 799-806.

Carabineiro, S.A.C., 2011. Adsorption of ciprofloxacin on surface-modified carbon materials.Water research, 45(15), 4583-4591.

Cardoso, O., Porcher, J.M., Sanchez, W., 2014. Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant sourceof aquatic environment contamination: Review of evidence and needfor knowledge. Chemosphere (sous presse).

Carmona, E., Andreu, V., Pico, Y., 2014. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. Science of the Total Environment 484, 53–63.

Catastini, C., Mullot, J.U., Boukari, S., Mazellier, P., Levi, Y., Cervantes, P., Ormsby, J.N., 2008.Assessment of antineoplasic drugs in effluents of two hospitals.Water Quality, 39(2), 172-180.

Cauzzi, N., 2007. Évaluation de l'éco-compatibilité de sédiments contaminés, traités et non traités par un procédé physico-chimique, dans le cadre d'un scénario de dépôt en gravière - Étude en microcosmes aquatiques. Thèse INSA de Lyon - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet au LSE de l'ENTPE. Villeurbanne: INSA de Lyon, 341p.

Cavalié, P., Coignard, F., Leclerc, S., Maugendre, P., Rozet, K., 2003. Analyse des ventes de médicaments aux officines et hôpitaux en France 1991-2001. Afssaps - Direction des Etudes Médico-Economiques et de l'Information Sientifique. 3ème édition: 94p.

Cavalié, P., De Calan, C., Gourlay, M.L., Comby, V., 2005. Analyse des ventes de médicaments aux officines et hôpitaux en France 1993-2003. Afssaps - Direction des Etudes Médico-Economiques et de l'Information Sientifique. 5ème édition. Saint-Denis: 116p.

Chang, T.K., Weber, G.F., Crespi, C.L., Waxman, D.J., 1993.Differential activation of cyclophosphamide and ifosphamide by cytochromes P450 2B and 3A in human liver microsomes.Cancer Research, 53, 5629.

Chang, T.K., Yu, L., Goldstein, J.A., Waxman, D.J., 1997.Identification of the polymorphically expressed CYP2C19 and the wild-type CYP2C9-ILE359 allele as low-Km catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation.Pharmacogenetics, 7, 211.

Chapman, P.M, 2006. Emerging substances - Emerging problems? Environmental Toxicology Chemestry, 25(6), 1445-1447.

Charles, G.D., Gennings, C., Zacharewski, T.R., Gollapudi, B.B., Carney, E.W., 2002. Assessment of interactions of diverse ternary mixtures in an estrogen receptor-alpha reporter assay. Toxicology Application Pharmacology, 180, 11–21.

Chou, T.C., 2006.Theoretical Basis, Experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacological Reviews, 58, 621–681.

Chou, T.C., 2011. The mass-action law based algorithm for cost-effective approach for cancer drug discovery and development. American Journal of Cancer Research, 1, 925.

Chow, L.W., Loo, W.T., 2003. The differential effects of cyclophosphamide, epirubicin and 5-Fluorouracil on apoptotic Marker (CPP-32), Pro-Apoptotic Protein (p21 WAF- 1) and anti-apoptotic protein (bcl-2) in reast Cancer Cells.Breast cancer research and treatment, 80, 239–244.

Christensen, F.M., 1998. Pharmaceuticals in the environment-A Human risk? Regulatory toxicology and pharmacology, 28, 212-221.

Clément, B., 1994. La toxicité aiguë des lixiviats de décharge. Apports respectifs et complémentarité des approches biologique et physico-chimique. Thèse de Biologie et Biochimie Appliquées à l'Unniversité de Savoie et au LSE de l'ENTPE. Vaulx-en-Velin et Chambéry: Université de Savoie - ENTPE, 323p.

Clément, B., 2006. Apports des essais en microcosmes aquatiques lentiques de laboratoire àl'évaluation écotoxicologique des polluants. Mémoire d'HDR - INSA de Lyon et UniversitéLyon1, Spécialité Biologie et Biochimie Appliquées au LSE de l'ENTPE. Vaulx-en-Velin: 277p.

Cleuvers, M., 2003.Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects.Toxicology Letter,142(3), 185-194.

Coesier, C.M, Spinelli, S., Lin, L., Roig, B. Touraud, E., 2009. Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? Environment International, 35(5) 789-792.

Coezy, E., Borgna, J.L., Rochefort, H., 1982. Tamoxifen and Metabolites in MCF7 Cells: Correlation between Binding to Estrogen Receptor and Inhibition of Cell Growth. Cancer Research, 42, 317-323.

Colborn, T., Saal, F.S.V., Soto, A.M. 1993.Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. Environmental Health Perspectives, 101(5), 378-384.

Coller, J.K., 2003. Oxidative metabolism of tamoxifen to Z-4-hydroxytamoxifen by cytochrome P450 isoforms: An appraisal of in vitro studies. Clinical Experiment in Pharmacology Physiology, 30, 845-848.

Coquery, M, Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusebe, M., 2007. Occurence and removal efficency of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and firts results (Poster). SETAC, Potro.

Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., Cory, J.G., 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun, 3, 207-212.

Costantini, D., Metcalfe, N.B., Monaghan, P., 2010. Ecological processes in a hormetic framework. Ecology Letters, 13, 1435-1447.

Crane, M., Watts, C., Boucard, T., 2006.Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals.Science of the Total Environment,367, 23-41.

Cox MF, 1994 Surfactants - Detergents and Cleaners: A handbook for formulators. In. Munich: Hanser Gardner Publications Inc. pp. 43-89.

Crewe H.K., Ellis S.W., Lennard M.S., Tucker G.T., 1997.Variable contribution of cytochromes P4502D6, 2C9 and 3A4 to the 4- hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. Biochemestry Pharmacology, 53, 171-178.

D

D'Abrosca, B., Fiorentino, A., Izzo, A., Cefarelli, G., Pascarella, M.T., Uzzo, P., Monaco, P., 2008. Phytotoxicity evaluation of five pharmaceutical pollutants detected in surface water on germination and growth of cultivated and spontaneous plants. Journal of Environmental Science and Health, Part A 43, 285-294.

Dansette P.M., Bonierbale E., Minoletti C., Beaune P.H., Pessayre D. and Mansuy D. (1998). Drug-induced immunotoxicity.European journal of drug metabolism and pharmacokinetics, 23(4), 443-451.

Darvari, R., Boroujerdi, M., 2004.Concentration dependency of modulatory effect of amlodipine on P-glycoprotein efflux activity of doxorubicin-a comparison with tamoxifen.Journal of Pharmacy Pharmacology, 56, 985-91.

Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? Environmental Health Perspectives, 107(Supplement 6), 907-938.

DCE (2000). Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. JO L. 327 du 22 décembre 2000 : 1-80.

Dearfield, K.L, Bender, E.S, Kravitz, M., Wentzel, R., Slimak, M.W., Farland, W.H., Gilmant, P., 2005. Ecological Risk assessment issues identified during the US Environmental Protection Agency's examination of risk assessment practices. Integration of Environmental Assessment Management, 1, 73-76.

Deblonde, T., Hartemann, P., 2013. Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals. Public health, 127, 312-317.

Degen, G. H., 1993. SEMV cell cultures: a model for studies of prostaglandin-H synthase mediated metabolism and genotoxicity of xenobiotics. Toxicology Letters, 67, 187-200.

Degen, G. H., Eling, T. E., McLachlan, J. A., 1982. Oxidative metabolism of diethylstilbestrol by prostaglandin synthetase.Cancer Research, 42, 919-923.

De Jonge, M.E., Huitema, A.D.R, Rodenhuis, S., Geijnen, J.H., 2005. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. Clinical Pharmacokinet, 44(11), 1135-1164.

Della Greca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Previtera, L., Rubino, M., Temussi F., 2004. Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms.Chemosphere, 54, 629-637.

Deloffre-Bonnamour, N., 1995. Les rejets des établissements de santé : des effluents liquides auxdéchets solides. Mémoire de maîtrise - IUP Génie de l'Environnement - Ecodéveloppement -Université Claude Bernard - Lyon 1. Lyon: 75p.

Desai, P.B., Nallani, S.C., Sane, R.S., Moore, L.B., Goodwin, B.J., Buckley, D.J., Buckley, A.R., 2002. Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregnane X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. Drug Metabolism Disposition, 30, 608-612.

Desta, Z., Ward, B.A., Soukhova, N.V., Flockhart, D.A., 2004. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. Journal of Pharmacologyand Experimental Therapeutics. 310, 1062–1075.

Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J., Monod, G., 1998. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501a induction in chub (Leuciscus cephalus).Marine Environmental Research, 46(1-5), 257-262.

Devillers, J., 2000. Limites et perspectives des modèles en écotoxicologie. Club CRINenvironnement et société, MATE. Modélisation en écotoxicologie. ECRIN ed. Paris. pp. 181-197.

De Waziers, I., Cugnenc, P.H., Yang, C.S., Leroux, J.P., and Beaune, P.H., 1990. Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 253, 387-394.

Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009.Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models.Cell Biology and Toxicology, 25(1), 5-32.

Doll, T.E., Frimmel, F.H., 2003. Fate of pharmaceuticals—photodegradation by simulated solar UV-light. Chemosphere, 52, 1757-1769.

Dowers, T.S., Qin, Z.H., Tatcher, G.R.J., Bolton, J.L., 2006.Bioactivation of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). Chemistry Research in Toxicology, 19(9), 1125-1137.

Dremont, C., Hadjali, R., 1997. La gestion des effluents liquides en milieu hospitalier. mémoire deDESS Technologies Médicales Hospitalières. Compiègne: Université de Technologie deCompiègne, 30p.

Drusano, G.L., Weir, M., Forrect, A., Plaisance, K., Emm, T., Standiford, H.C., 1987. Pharmacokinetics of intravenously administered ciprofloxacin in patients with various degrees of renal function. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 31(6), 860-864.

Dunlap, P.V., 1999. Corum regulation of luminescence in Vibrio fischeri.Journal of Molecular microbiology and Biotechnology, 1, pp. 5-12.

E

Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y.S., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K., Yoshimura, H., 2004.Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. Chemosphere, 57, 1733-1738.

Ehlhardt, W.J., Beaulieu Jr, B.B., Goldman, P., 1988. Mammalian cell toxicity and bacterial mutagenicity of nitrosoimidazoles.Biochemical pharmacology, 37, 2603-2606.

Emmanuel, E., 2004a. Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluentshospitaliers. Thèse INSA de Lyon - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet. Lyon: 259p.

Emmanuel, E., 2004b. Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse Spécialité Sciences et Techniques du Déchet. Villeurbanne et Vaulx en Velin: INSA de Lyon et LSE-ENTPE, 259p.

Emmanuel, E., Keck, G., Blanchard, J.M., Vermande, P., Perrodin, Y., 2004. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater.Environment International, 30(7),891-900.

Environment Canada, 1992. Biological Test Method: Growth InhibitionTest Using FreshwaterA Iga Selenastrum capricornutum. Environment Canada, EPS 1-25.

F

Fardel, O., Morel, F., Ratanasavanh, D., Fautrel, A., Beaune, P., Guillouzo, A., 1992. Expression of drug metabolizing enzymes in human HepG2 hepatoma cells.Cellular and Molecular Aspects of Cirrhosis 216, 327-330.

FDA, 2011. Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies guidance of industry VICH GL49.

Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006.Ecotoxicology of human pharmaceuticals.Aquatic Toxicology, 76(2), 122-159.

Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., 2003b. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. Ecotoxicology Environmental Safety, 55(3), 359-370.

Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barcelo, D., 2013. Development of UPLC-MS/MS method for the determination of ten anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information-dependent acquisition tool (IDA) sewage samples. Anal Bioanalytical Chemistry, 405, 5937-5952.

Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez-Mozaz, S., Barcelo, D., 2012. Compréhensive Study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. Science of the Total Environment, 438, 404-413.

Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, P., Thybaud, E., 2000. Induction of Fish Vitellogenin and Alterations in Testicular Structure: Preliminary Results of Estrogenic Effects in Chub (Leuciscus cephalus). Ecotoxicology, 9, 127-135.

Fleming, R.A., 1997.An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology.Pharmacotherapy, 17(146), 271-276.

Forbes, V.E., Forbes,T.L., 1997. Ecotoxicologie - Théorie et applications, INRA Editions, Paris,256.

Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology.Environmental Toxicology Chemistry, 25, 272-280.

Fremery, L.,Rigaud, S., 2001. Que deviennent les effluents radioactifs hospitaliers? Sciences et Technologie de l'Eau. Montpellier: 9p.

Frenzili, G., Nigro, M., Lyons, B., 2009. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environment. Mutation Research, 681, 80-92.

Fuhr, U., Anders, E.M., Mahr, G., Sörgel, F., Staib, A.H., 1992.Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450 1A2 activity in vivo and in vitro. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 36, 942-948.

G

Gamboa da Costa, G., Marques, Fu, X., Churchwell, M.I., Wang, Y.P., Doerge, R., Beland, F.A., 2007.Effect of *N,N*-didesmethyltamoxifen upon DNA adduct formation by tamoxifen and α-hydroxytamoxifen. Cancer Letters, 257(2), 191-198.

Gamboa da Costa, G., McDaniel-Hamilton, P., Heflich, R.H., Marques, M.M., Beland, F.A., 2001.DNA adduct formation and mutant induction in Sprague–Dawley rats treated with tamoxifen and its derivatives. Carcinogenesis, 22(8), 1307-1315.

Garavito, R. M., DeWitt, D. L., 1999. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. Biochimica et Biophysica Acta, 1441, 278-287.

Garric, J., Ferrari, B., 2005. Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveauxd'exposition et effet biologique : que savons nous ? Revue des sciences de l'eau, 18(3), 307-330.

Gartiser, S., Brinker, L., Erbe, T., kummerer, K., Willmund, R., 1996.Belastung von Krankenhausabwasser mit gefährlichen Stoffen im Sinne § 7a WHG. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 24(2), 90-97.

Gilard, V., Martino, R., Malet-Martino, M.C., Kutscher, B., Mueller, A., Niemeyer, U., Pohl, J., Polymeropoulos, E.E., 1994.Chemical and biological evaluation of hydrolysis products of cyclophosphamide. Journal of Medicinal Chemistry, 37, 3986-3993.

Glatt, H., Davis, W., Meinl, W., Hermesdorfer, H., Venitt, S.,Phillips, D., 1998. Rat but not human sulfotransferase activates atamoxifen metabolite to produce DNA adducts and genemutations in bacteria and mammalian cells in culture. Carcinogenesis, 19, 1709-1713.

Glue, P., Clement, R.P., 1999. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism-basic concepts and methods of assessment. Cellular Molecular Neurobiology, 19, 309-323.

Greene, J.C., Bartels, C.L., Warren-Hicks, W.J., Parkhurst, B.R., Linder, G.L.,Peterson, S.A., Miller, W.E., 1989. Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites.U.S. Environmental Protection Agency, EPA 6Wl3-88/029.

Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, D., 2006.Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386(4), 941-952.

Grue, C.E., Gardner, S.C., Gilbert, P.L., 2002.On the significance of pollutant-induced alterations in the behavior of fish and wildlife. Dell'Omo G. *Behavioural Ecotoxicology*, Jon Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, 1-90.

Gruenert, D.C., Basbaum, C.B., Widdicombe, J.H., 1990.Long-term culture of normal and cystic fibrosis epithelial cells grown under serum-free conditions. In Vitro Cellular & developmental Biology: Journal Of The Tissue Culture Association, 26, 411-418.

Grung, M., Kallqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K.V., 2008. Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. Ecotoxicology and Environmental Safety, 71, 328-340.

Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M., Batt, A.M., Paquet,, F., Voisin, P., Aigueperse, J.,Gourmelon, P., Souidi, M., 2006. Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. Annales de biologie Clinique, 64(6), 535-548.

Guiliani, F., Koller, T., Würgler, F.E., Widmer, R.M., 1996.Detection of genotoxic activity in native hospital waste water by the umuC test. Mutation Research/Genetic Toxicology, 368(1), 49-57.

Gupta, R.C., 1993. 32P-postlabelling analysis of bulky aromatic adducts. IARC Scientific Publications, 11-23.

Guo, Y.L.L., Lambert, G.H., Hsu, H.C., 1995. Growth Abnormalities in the Population Exposed in-Utero and Early Postnatally to Polychlorinated-Biphenyls and Dibenzofurans. Environmental Health Perspectives, 103, 117-122.

H

Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lankzy, P.F., Ingerslev, F., Holten Lutzhoft, H.C., Jorgensen, S.E., 1998.Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review.Chemosphere, 36(2), 357-393.

Harris, C.C., 1991. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. Cancer Research, 51, 5023-5044.

Harris, R.C., McKanna, J.A., Akai, Y., Jacobson, H.R., Dubois R.N., Breyer, M.D., 1994. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. Journal of Clinical Investigation, 94, 2504-2510.

Hartemann, P., 2006. Approche pour l'évaluation des effets émergents des résidus de médicaments dans les eaux. Environnement, Risques et Santé,5, 307-310.

Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L., 2004.Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. Mutagenesis, 19(1), 51-59.

Hartmann, A., Golet, E.M., Gartiser, S., Alder, A.C., Koller, T., Widmer, R.M., 1999. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital waste waters. Archaic Environmental Contamination Toxicology, 36, 115-119.

Hartwig, A., Schwerdtle, T., 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. Toxicology Letters, 127, 47-54.

Harwood, V.J., Whitlock, J., Withington, V., 2000. Classification of Antibiotic Resistance Patterns of Indicator Bacteria by Discriminant Analysis: Use in Predicting the Source of Fecal Contamination in Subtropical Waters. Applied and Environmental Microbiology, 66, 3698-3704.

Hasler, J.A., 1999.Pharmacogenetics of cytochromes P450. Molecular Aspects of Medicine, 20, 25-137.

Hastings,J.W., Nealson, K.H., 1977. Bacterial bioluminescence. Annual Reviews in Microbiology, 31, 549-595.

Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology, 30, 445-600.

Heberer, T., Dunnbier, U., Reilich, C., Stan H.J.. 1997. Detection of drugs and drug metabolites in ground water samples of a drinking water treatment plant. Fresenius Environmental, 6, 438-443.

Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicology Letters, 131(1-2), 5-17.

Hebert, P.D., Luiker, M.M., 1996. Genetic effects of contaminant exposure—towards an assessment of impacts on animal populations. Science of the Total Environment, 191, 23-58.

Hengstler, J.G., Hengst, A., Fuchs, J., Tanner, B., Pohl, J., Oesch, F., 1997.Induction of DNA crosslinks and DNA strand lesions by cyclophosphamide after activation by cytochrome P450 2B1.Mutation Research, 373, 215.

Hernando, M.D., Heath, E., Petrovic, M., Barcelo, D., 2006.Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters.A pilot-survey study. Anal Bioanalytical Chemestry, 385, 985-991.

Herold, C., Ocker, M., Ganslmayer, M., Gerauer, H., Hahn, E.G., Schuppan, D., 2002. Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. British journal of Cancer, 86, 443-448.

Hietanen, E., Husgafvel-Pursiainen, K., Vainio, H., 1997. Interaction between dose and susceptibility to environmental cancer: a short review. Environmental Health Perspectives, 105, 749-754.

Hignite, C., Azarnoff, D.L., 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. Life Sciences, 20(2),337-341

Hinfray, N., Palluel, O., Piccini, B., Sanchez, W., Aït-Aïssa, S., Noury, P., Gomez, E., Geraudie, P., Minier, C., Brion, F., Porcher, J.M., 2010. Endocrine disruption inwild populations of chub (Leuciscuscephalus) in contaminated French streams.Science of the Total Environment, 408, 2146-2154.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L., 1999.Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.Science of the Total Environment, 225,109-118.

Hoffmann, G.R., 2009. A Perspective on the Scientific, Philosophical, and Policy Dimensions of Hormesis. Dose-Response, 7, 1–51.

Horwitz, K.B., Costlow, M.E., McGuire, W.L., 1975. MCF-7: a human breast cancercell line with estrogen, androgen, progesterone and glucocorticoid receptors. Steroids, 26, 785-795.

Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L., Gray, L.E., 2008.Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go. Toxicological Sciences, 105(2), 235-259.

Huang, D., Zhang, Y., Wang, Y., Xie, Z., Ji, W., 2007. Assessment of the genotoxicity in toad Bufo raddei exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 629, 81–88.

Huang, Z., Roy, P., Waxman, D.J., 2000.Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. Biochemical Pharmacology, 59, 961

Hukkanen, J., 2000. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human lung.University of Oulu, Acta universitatis Ouluensis, D media, 621, 69p.

Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. Toxicological Letters 133, 1-16.

Hussein, S.P., Harris, C.C., 1998. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. Cancer Research, 15, 4023-4037.

J

Janknegt, R., 1990. Drug interactions with quinolones.Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 26, 7-29.

Jean, G., 1991. Évaluation de la toxicité aigüe de solutions synthétiques et d'effluents à partir d'un àpartir d'un muti-test macroinvertébrés : le MTM. Comparaison des réponses desmacroinvertébrés avec celles de Photobacterium phosphoreum, Daphnia magna et Brachydanio rerio. Thèse.Villeurbanne: INSA de Lyon - LAEPSI, 213p.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science & Technology, 32(17), 2498-2506.

Jolibois, B., Guerbet, M., Vassal, S., 2003. Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOSchromotest and Ames fluctuation test.Chemosphere, 52, 539-543.

Johnson, A.C., Jürgens, M.D., Williams, R.J., Kümmerer, K., Kortenkamp, A., Sumpter, J.P., 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. Journal of Hydrology, 348, 167-175.

Jordan, V.C., Koerner, S., 1975. Tamoxifen (ICI 46,474) and the human carcinoma 8S oestrogen receptor.European Journal of Cancer, 11, 205-206.

Jorgensen, S.E., Halling-Sorensen, B., 2000.Drugs in the environment.Chemosphere, 40, 691-699.

K

Kaiser, K.L.E., Ribo, J.M., 1988. Photobacterium phosphoreum toxicity bioassay.Toxicity data compilation.Toxicity Assessment International Journal, 3, 795-237.

Kamat, A.M., DeHavena, J.I., Lamma, D.L., 1999. Quinolone antibiotics: a potential adjunct to intravesical chemotherapy for bladder cancer. Urology, 54(1), 56-61.

Kanuri, M., Minko, I.G., Nechev, L.V., Harris, T.M., Harris, C.M., Lloyd, R.S., 2002. Error prone translesion synthesis past gamma-hydroxypropano deoxyguanosine, the primary acrolein-derived adduct in mammalian cells. Journal of Biological Chemistry, 277, 18257-18265.

Kawanishi, S., Hiraku, Y., Murata, M., and Oikawa, S., 2002.The role of metals in sitespecific DNA damage with reference to carcinogenesis. Free Radical Biology & Medicine, 32, 822-832.

Keher, J.P., Biswal, S.S., 2000. The molecular effects of acrolein. Toxicological Sciences, 57(1), 6-15.

Kerbusch, T., De Kraker, J., Keizer, H.J., Van Putten, J.W., Groen, H.J., Jansen, R.L., Schellens, J.H., Beijnen, J.H., 2001. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ifosfamide and its metabolites. Clinical Pharmacokinet, 40, 41-62.

Ketterer, B., Meyer, D.J., Taylor, J.B., Pemble, S., Coles, B., Fraser, G., 1990.GSTs and protection against oxidative stress. In: Glutathione-S-transferases and drug resistance (Hayes J.D., Pickett C.B.and Mantle T.J., Eds) Taylor and Francis, London 97-109.

Khan, K.N., Knapp, D.W., Denicola, D.B., Harris, R.K., 2000.Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. American Journal of Veterinary Research, 61, 478-481.

Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.G., Park, J., 2006.Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea.Environment International, 33(3), 370-375.

Kisanga, E.R., Mellgren, G., Lien, E.A., 2005. Excretion of Hydroxylated Metabolites of Tamoxifen in Human Bile and Urine. Anticancer Research, 25(6), 4487-4492.

Knasmuller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch- Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., and Langer, T., 1998.Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 402, 185-202.

Kodawara, T., Masuda, S., Yano, Y., Matsubara, K., Nakamura, T., Masada, M., 2014.Inhibitory effect of ciprofloxacin on β-glucuronidase-mediated deconjugation of mycophenolic acid glucuronide. Biopharmaceutics & Drug Disposition (sous presse).

Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegard, B.,Söderström, H., Larsson, D.G.J., 2011.Pyrosequencing of antibioticcontaminatedriver sediments reveals high levels of resistance and genetransfert elements. PLoS ONE, 6, 1-7.

Kolpin, D.W., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, E.M., Zaugg, S. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Environmental Science & Technology, 36(6), 1202-1211.

Kümmerer, K., 2005. Pharmaceuticals in the Environment, 2nd ed. Springer-Verlag.

Kümmerer, K., Henninger, A., 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. Clinical Microbiology and Infection, 9, 1203-1214.

Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. Chemosphere,45(6-7),957-969.

Kümmerer, K., Meyer, M., Steger-Hartmann, T., 1997.Biodegradability of the anti-tumour agent Ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage.Water Research, 31, 2705-2710.

L

Lafaurie, M., Narbonne, J.F., Galgani, F., 1992. Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. Analysis Magazine, 20, 27-33.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson. Paris.

Lange, R., Hutchinson, T.H., Croudace, C.P., Siegmund, F., Schweinfuryh, H., Hampe, P., Panter, G.H., Sumpter, J.P., 2001. Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (Pimephales promelas).Environmental Toxicology Chemistry, 20, 1216-1227.

Lavoué, J., Bégin, D., Gérin, M., 2002. La substitution des solvants par les nettoyants aqueux – Ledégraissage des métaux. IRSST; Université de Montréal. Bilans de connaissances / Rapport B-064. Montréal: 138p.

Lawrence, J.W., Darkin-Rattray, S., Xie, F.,Neims, A.H., Rowe, T.C., 1993.4-Quinolones cause a selective loss of mitochondrial DNA from mouse L1210 leukemia cells. Journal of Cellular Biochemistry, 51, 165-174.

Le Corre, K.S., Ort, C., Kateley, D., Allen, B., Escher, B.I., Keller, J., 2012. Consumption-based approach for assessing the contributionof hospitals towards the load of pharmaceutical residues in municipalwastewater.Environment International, 45, 99-111.

Lefebvre, E., 2008. En France, les bactéries résistent mieux que les antibiotiques. Les Echos, n°11/01/08, pp. 17.

Le Perchec, P., Richard, M., 1994. Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection – Uneintroduction à la science cosmétologique. Editions C. Paris: Nathan. 144p.

Leprat, P., 1998. Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques? In: Santé etenvironnement hospitalier, les Assises Nationales QUALIBO 1998, Caen, 10-13.

Leprat, P., 1999. Caractéristiques et impacts des rejets liquides hospitaliers. Techniques hospitalières, 634, 56-57.

Lémière, S., 2004. Intérêt du test des comètes pour l'évaluation de la génotoxicité environnementale. Thèse de doctorat des sciences de la vie, Intitulé toxicologie de l'environnement, Université de Metz, école doctorale RP2E, 200p.

Levenson, A.S., Jordan, V.C., 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. Cancer Research, 57, 3071-3078.

Lewis, D.F., 2004. 57 varieties : the human cytochromes P450. Pharmacogenomics, 5, 305-18.

Li, D., Yu, T., Zhang, Y., Yang, M., Li, Z., Liu, M., Qi, R., 2010. Antibiotic resistancecharacteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline productionwastewater treatment plant and the receiving river.Applied Environmental Microbiology, 76, 3444-3451.

Li, J., Al-Azzawi, F., 2009.Mechanism of androgen receptor action.Maturitas, 63(2), 142-148.

Lin, Z., Du, J., Yin, K., 2004. Mechanism of concentration addition toxicity : they are different for nonpolar narcotic chemicals and reactive chemicals. Chemosphere, 54(11), 1691-1701.

Lindberg, R.H., Björklund, K., Rendahl, P., Johansson, M.I., Tysklind, M., Andersson, B.A.V., 2007.Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants.Water Research, 41, 613-619.

Liu, B., Nie, X., Liu, W., Snoeijs, P., Guan, C., Tsui, M.T.K., 2011. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in Selenastrum capricornutum.Ecotoxicology and Environmental Safety, 74, 1027-1035.

Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C,Mitchelmore, C.L., Moore, M.N., Peters,L.D., Pipe, R.K., 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (Mytilus edulis L.) and other mytilids. International Journal of Environment and Pollution, 13, 56-91.

Lopez-Serna, R., Petrovic, M., Barcelo, D., 2012. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). Science of the Total Envionment, 440, 280-289.

Lu, L.J.W., Disher, R.M., Reddy, M.V., Randerath, K., 1986. 32P-postlabelling assay in mice of transplacental DNA damage induced by the environmental carcinogens safrole, 4-aminobuphenyl and benzo(a)pyrene. Cancer Research, 46, 3046-3054.

Lu, S.C., Huang, H.Y., 1994. Comparison of sulfur amino acid utilization for GSH synthesis between HepG2 cells and cultured rat hepatocytes.Biochemical.Pharmacology, 47, 859-869.

Luch, A., 2005. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. Nature Reviews. Cancer, 5, 113-125.

M

Ma, J., Lu, N., Qin, W., Xu, R., Wang, Y., Chen, X., 2006. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. Ecotoxicology and Environmental Safety, 63, 268-274.

Majima, M., Amano, H., and Hayashi, I., 2003.Prostanoid receptor signaling relevant to tumor growth and angiogenesis. Trends In Pharmacological Sciences, 24, 524-529.

Manderville R & Pfohl-Leszkowicz, A., 2008.Bioactivation and DNA Adduction as a Rationale for Ochratoxin A Carcinogenesis. World Mycotoxin Journal 1 (3) 357-367Manickum, T., John, W., 2014.Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa).Science of the Total Environment, 468(469), 584-597.

Mansotte, F., 2000. Les rejets des établissements de santé. DDAS Seine-Maritime - Synthèse réaliséet complété sur la base du travail de F. Lebrun - Chargé d'études Environnement – Cetrehospitalier du havre - CLIN - Club Environnement: 68p.

Mansotte, F., Jestin, E., 2000. Les rejets liquides des établissements de santé : Caractérisation à lasource et impact sur l'environnement marin côtier. Direction départementale des affairessanitaires et sociales de la SeineMaritime, Agence de l'eau de la SeineNormandie, Nanterre, 2000.

Marine Pollution Bulletin, 2007.Implementation of the water framework directive in European marine waters.Marine Pollution Bulletin, special issue 55, 1-298.

Marquis V. 2005. L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérogène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post-marquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A. Thèse. Toulouse : INP de Toulouse – SEVAB. 285p.

Martins, N., Pereira, R., Abrantes, N., Pereira, J., Gonçalves, F., Marques, C.R., 2012. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. Ecotoxicology, 21, 1167-1176.

Martins, A.F., Vasconcelos, T.G., Henriques, D.M., Frank, C.S., König, A., Kümmerer, K., 2008. Concentration of Ciprofloxacin in Brazilian Hospital Effluent and Preliminary Risk Assessment: A Case Study. CLEAN – Soil, Air, Water, 36, 264-269.

Mayfield, C.I., 1993. 2: Microbial Systems. In: Calow P. Handbook of ecotoxicology. London: Blackwell scientific publications, 1, 9-27.

McLellan, R.A., Drobitch, R.K., Monshouwer, M., Renton, K.W., 1996. Fluoroquinolone antibiotics inhibit cytochrome P450-mediated microsomal drug metabolism in rat and human. Drug Metababolism Disposition, 24, 1134-1138.

McMurray, C.T., Tainer, J.A., 2003. Cancer, cadmium and genome integrity. Nature Genetics, 34, 239-241.

Mersch-Sundermann, V., Knasmuller, S., Wu, X. j., Darroudi, F., and Kassie, F., 2004.Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. Toxicology, 198, 329-340.

Metcalfe, C.D., Miao, X.C., Koenig, B.G., Struger, J., 2009. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. Environmental Toxicology and Chemistry, 22(12), 2881-2889.

Michaud, V., Turgeon, J., 2010.Assessment of Competitive and Mechanism-Based Inhibition by Clarithromycin: Use of Domperidone as a CYP3A Probe-Drug Substrate and Various Enzymatic Sources Including a New Cell-Based Assay with Freshly Isolated Human Hepatocytes. Drug Metabolism Letters, 4(2), 69-76.

Michel, C., 2011. Biomarqueurs de génotoxicité chez Dreissena polymorpha : indicateur de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions à l'ADN. Thèse. Anthony : Université Pierre et Marie Curie, GRN, 218p.

Migliore, L., Cozzolino, S., Fiori, M., 2003. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. Chemosphere, 52, 1233-1244.

Miller, J.A., 1970. Carcinogenesis by chemicals: an overview—G.H.A. Clowes memorial lecture. Cancer Research, 30(3), 559-576.

Miller, E.C., Miller, J.A., 1979. Milestones in chemical carcinogenesis. Seminars in Oncology, 6(4), 445-460.

Miller, E.C., Miller, J.A., 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. Cancer, 47, 2327-2345.

Miller, M.S., McCarver, D.G., Bell, D.A., Eaton, D.L., Goldstein, J. A., 1997. Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. Fundamental And Applied Toxicology: Official Journal Of The Society Of Toxicology, 40, 1-14.

Minckoitz, G., Kummel, S., Du Bois, A., 2008. Pegfilgrastim + or - ciprofloxacin for primary prophylaxis with TAC (docetaxel/doxorubicin,cyclophosphamide) chemotherapy for breast cancer. Results from the GEPARTRIO study. Annals of Oncology, 19, 292-298.

Moldovan, Z., 2006.Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania.Chemosphere, 64(11), 1808-1817.

Monks, T.J., Anders, M.W., Dekant, W., Stevens, J.L., Lau, S.S., Van Bladeren, P.J, 1990. Glutathione conjugate mediated toxicities. Toxicology and Applied Pharmacology, 106, 1-19.

Moore, M.J., 1991. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide.Clinical Pharmacokinetics, 20, 194.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunology Methods, 65, 55-63.

Mourato, L.L., Beland, F.A., Marques, M.M., 1999. 32P-postlabeling of N-(deoxyguanosin-8-yl)arylamine adducts: a comparative study of labeling efficiencies. Chemical Research in Toxicology, 12, 661-669.

Mugford, C.A., Kedderis, G.L., 1998.Sex-dependent metabolism of xenobiotics. Drug Metabolism Reviews, 30, 441-498.

N

Nacci, D.E., Cayula, S., Jackim, E., 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. Aquatic Toxicology, 35(3-4), 197-210.

Nash,J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M, Wester, P.W., Brion, F.,Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the PharmaceuticalEthynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. Environmental Health Perspectives, 112(17), 1725- 1733.

Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., 1987. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. DNA, 6, 1-11.

Nelson, D.R, Koymans, L., Kamataki, T., 1996.P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics, 6, 1-42.

Nishiyama, T., Ogura, K., Nakano, H., Ohnuma, T., Kaku, T., Hiratsuka, A., Muro, K., Watabe, T., 2002. Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifens by human liver UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. Biochemical Pharmacology, 63(10), 1817-1830.

NRC, 1987.Biological markers in environmental health research. Environ Health Perspective, 74, 3-9.

Nunn, J.W., Livingstone, D.R., Chipman,J.K., Taylor, E.W., 1996. Effect of genetic toxicants in aquatic organisms.Toxicology of Aquatic Pollution, Cambridge University Press.

O

O’Neill, K., Chen, S., Diaz Brinton, R., 2004. Impact of the selective estrogen receptor modulator, tamoxifen, on neuronal outgrowth and survival following toxic insults associated with aging and Alzheimer’s disease. Experimental Neurology, 188, 268-278.

Ohno, K., Ishihata, K., Tanaka-Azuma, Y., Yamada, T., 2008. A genotoxicity test system based on p53R2 gene expression in human cells: Assessment of its reactivity to various classes of genotoxic chemicals. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 656, 27-35.

Osorio, V., Perez, S., Ginebreda, A., Barcelo, D., 2012. Pharmaceuticalson a sewage impacted section of a Mediterranean River (LlobregatRiver, NE Spain) and their relationship with hydrological conditions.Environmental Science Pollution Research, 19(4), 1013-1025.

Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 123(1), 291-298.

Otieno, M.A., Baggs, R.B., Hayes, J.D., Anders, M.W., 1997. Immunolocalization of microsomal glutathione S-transferase in rat tissues. Drug Metabolism And Disposition: The Biological Fate Of Chemicals, 25, 12-20.

P

Palaniyappan, V., Nagalingam, A.K., Ranganathan, H.P., Kandhikuppam, K.B., Kothandam, H.P., Vasu, S., 2013.Antibiotics in South Indian coastal sea and farmed prawns (Penaeus monodon). Food Additive and Contaminant, 6(3), 196-199.

Pandey, S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Sharma, S., Srivastava, S.K., Verma, M.S., 2006.Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost Channa punctatus (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 65, 56–61.

Parry, J.M., Tweats, D.J., Al Mossawi, M.A.J, 1976. Monitoring the marine environment for mutagens. Nature, 264(5586), 538-540.

Peck, M., Gibson, R.W., Kortenkamp, A., Hill, E.M., 2004. Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom rivers. Environmental Toxicology Chemistry, 23,945-952.

Perry, R., Kang, Y., Greaves, B., 1995. Effects of tamoxifen on growth and apoptosis estrogen-dependent and –independent human breast cancer cells. Annals of Surgical Oncology, 2, 238-245.

Persoone, G., 1997. Development and first validation of a "(stock) culture free" algal microbiotest: the Algaltoxkit. Wells, P.G. et al. (Ed.) (1997). Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques and practice.

Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Torokne, A., Zarina, D., Manusadzianas, L., Nalecz-Jawecki, G., Tofan, L., Stepanova, N., Tothova, L., Kolar, B., 2003.A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. Environmental Toxicology ,18, 395-402.

Petrovic, M., Ginebreda, A., Acuña, V., Batalla, R.J., Elosegi, A., Guasch, H., De Alda, M.L., Marcé, R., Muñoz, I., Navarro-Ortega, A., Navarro, E.,Vericat, D., Sabater, S., Barcelo, D., 2012.Combined scenarios ofchemical and ecological quality under water scarcity inMediterranean rivers. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 30(8), 1269-1278.

Pfohl-Leszkowicz, A., 1994. Détection des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition aux cancérogènes de l'environnement. Analysis magazine, 22(1), 12-15.

Pfohl-Leszkowicz, A., 2008.Formation, persistence and significance of DNA adduct formation in relation to some pollutants from a broad perspective. Advance in Toxicology, 2, 183-240.

Pfohl-Leszkowicz A, 2014. Marqueur cytogénétiques en relation avec des polluants en milieu de travail et susceptibilité génétique. Connaissances scientifiques actuelles. Dans "Sécurité et prevention des risques en laboratoirede chimie et de biologie" André Picot & Jean Ducret (eds). Tec & Doc, Lavoisier, Paris pp 891-921

Pfohl-Leszkowicz, A., Weber-Lofti, F., Masfaraud, J.F., Devaux, A., Laouedj, A., Guillemaut, P., Malaveille, C., Rether, B., Monod, G., Dirheimer, G., 1993. DNA adduct detection: some applications to monitor exposure to environmental genotoxic chemicals., IARC Scientific Public., 124("Postlabelling methods for detection of DNA adducts"), 373-378.

Pfohl-Leszkowicz, A., Masfaraud, J.F., Weber-Lotfi, F., Marty, J., Guillemaut, P. & Castegnaro, M. 1996. Comparison of animal and plant DNA-adducts after exposure to benzo(a)pyrene, Polyclyclic Aromatic Compounds, 10, 323-331

PhACT Database, 2006. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA).

Phillips, D.H., 1997. Detection of DNA modifications by the 32P-postlabelling assay. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 378, 1-12.

Pinelli, E., El Adlouni C., Pipy, B., Quartulli, F. & Pfohl-Leszkowicz, A. 1999. Respective implication of cyclooxygenase and lipoxygenase in ochratoxin A genotoxicity on human epithelial lung cells, Environ Toxicol Pharmacol., 7, 95-107

Plackett, R.L., Hewlett, P.S., 1952. Quantal responses to mixtures of poisons. Journal of Royal Statistical Society B, 14, 141-163.

Pomati, F., Cotsapas, C.J., Castiglioni, S., Zuccato, E., Calamari, D., 2007a. Gene expression profiles in zebrafish (Danio rerio) liver cells exposed to a mixture of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations. Chemosphere, 70, 65-73.

Pomati, F., Orlandi, C., Clerici, M., Luciani, F., Zuccato, E., 2007b. Effects and Interactions in an Environmentally Relevant Mixture of Pharmaceuticals. Toxicological Sciences, 102, 129-137.

Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., Calamari D., 2006.Effets of a complexe mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells.Environmental Science and Technology, 40(7),2442-2447.

Prein, A.E., Thie, G.M., Alink, G.M., Koeman, J.H., Poels, C.L.M., 1978. Cytogeneticchanges in fish exposed to water of the river Rhine. Science of the Total Environment, 9(3), 287-291.

Prescott, S.M., Fitzpatrick, F.A., 2000. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. Biochimica et Biophysica Acta ,1470, 69-78.

Pruijn, F.B., DeWitte, R.S., 2004. A practical approach to improving drug transport in tumors. Current Drug Discovery, 29-32.

Q

Qureshi, A.A., Flood, K.V., Thompson, S.R., Janhurst, J.M., Inniss, C.S., Rokosh, D.A, 1932. Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. Dans: Aquatic toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference ASTM, J. G. Pearson, R. B. Foster et W. E. Bishop (éds), p. 179-195. Philadelphia, PA. ASTM.

R

Rabiet, M., 2006. Contamination de la resource en eau par les eaux usée dans un bassin versantméditerranéen - Apport des éléments majeurs, traces et terres rares. Thèse Université deMontpellier II. Spécialité Terre solide (géodynamique des enveloppes supérieures,paléobiosphère), Sciences de l'Eau dans l'Environnement Continental 368p.

Ramade, 2007. Introduction à l'écotoxicologie – Fondements et applications". Éditions TEC & DOC, France, 618 p.

Randall, W.A., Price, C.W., Welch, H., 1947. Demonstration of Hormesis (Increase in Fatality Rate) by Penicillin. American Journal of Public Health and the Nations Health, 37, 421-425.

Randerath, K., Reddy, M.V., Gupta, R.C., 1981.32P-postlabelling test for DNA damage. National Academic of Science of the Unites States of America, 78, 6126-6129.

Ravi, P.R., Vats, R., Kora, U.R., 2013. Effect of ciprofloxacin and grapefruit juice on oral pharmacokinetics of riluzole in Wistar rats: CYP1A2 inhibitors and riluzole kinetics. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 65, 337-344.

Reddel, R.R., Murphy, L.C., Sutherland, R.L., 1983. Effects of biologically active metabolites of tamoxifen on the proliferation kinetics of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. Cancer research, 43, 4618–4624.

Reddersen, K., Heberer, T., Dunnbier, U. 2002.Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water. Chemosphere, 49, 539-544.

Reddy, M.V., Randerath, K., 1986. Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. Carcinogenesis, 7, 1543-1551.

Ribo, J.M., Kaiser, K.L.E., 1983. Effects of selected chemicals to photoluminescent bacteria and their correlations with acute and sublethal effects on other organisms.Chemosphere, 12(11-12), 1421-1442.

Rihn, B.H., Hdou, T., Le Faou, A., 2001. Virus, produits antiseptiques et désinfectants La norme et seslimites. Dossier médico-technique (DMT), 86, 143-149.

Rivière, J.L., 1998. Évaluation du risque écologique des sols pollués. Tec & Doc Lavoisier. Paris.228p.

Rodier, J., Bazin, C., Broutin, J.P., Chambon, P., Champsaur, H., Rodi, L., 1996. L'analyse de l'eau : eauxnaturelles, eaux résiduaires, eau de mer. DUNOD.8ème ed. Paris. 1384p.

Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 2009. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environmental Toxicology and Chemistry, 15(3), 241-248.

Roy, P., Yu, L.J., Crespi, C.L., Waxman, D.J., 1999. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. Drug Metabolism Disposition, 27, 655.

Rowney, N.C., Johnson, A.C., Williams, R.J., 2009. Cytotoxic drugs in drinking water: a prediction and risk assessment exercise for the thames catchment in the United kingdom. Environmental Toxicology Chemistry. 28, 2733-2743.

Russell, A.D., Hugo, W.B., 2004.Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 4 ed. Ayliffe GA. Oxford: Blackwell Science. 688p.

Rydberg, B., Johanson, K.J., 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: DNA Repair Mechanisms, Friedberg EC, Fox CF (eds)." Academic Press, New York: 465-468.

S

Sane, R.S., Buckley, D.J., Buckley, A.R., Nallani, S.C., Desai, P.B., 2008.Role of human pregnane X receptor in tamoxifen- and 4-hydroxytamoxifen-mediated CYP3A4 induction in primary human hepatocytes and LS174T cells.Drug Metabism Disposition, 36, 946-954.

Santiago, S., Becker Van Slooten, K., Chèvre, N., Pardos, M., Benninghoff, C., Thybaud, E., Garrivier, F., 2002.Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques, avec les daphnies, les bactériesluminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement. SoluvalInstitut Forel, Université de Genève, École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Suisse. 55p.

Santos, LHMLM, Araújo. A.N, Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, MCBSM., 2010. Ecotoxicological aspects relatedto the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Journal of Hazardous Materials, 175(1-3), 45-95.

Schaeffer, R.C., 1979. Failure of antivenin or corticosteroids to prevent lethal rattlesnake venom shock in the rat: R.C. Schaeffer, Jr., R.W. Carlson and M.H. Weil Shock Research Unit, University of Southern California, Los Angeles, USA. Toxicon 17, 163.

Schaider, L.A., Rudel, R.A., Ackerman, J.M., Dunagan, S.C., Brody, J.G., 2014.Pharmaceuticals, perfluorosurfactants, and other organic wastewater compounds in public drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. Science of the Total Environment, 468(469), 384-393.

Schlosser, M.J., Shurina, R.D., Kalf, G.F., Prostaglandin H synthase catalyzed oxidation of hydroquinone to a sulfhydryl-binding and DNA-damaging metabolite. Chemical Research in Toxicology, 3, 333-339.

Schulman, L.J., Sargent, E.V., Naumann, B.D., Faria, E.C., Dolan, D.G., Wargo, J.P., 2002. A Human Health Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. Human and Ecological Risk Assessment, 8, 657-680.

Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., 2003.Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiology Ecology, 43(3),325-335.

Scripture, C.D., Sparreboom, A., Figg, W.D., 2005. Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. The Lancet Oncology, 6, 780-789.

Seidegard, J., and Ekstrom, G. (1997).The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics.Environmental Health Perspectives105, 791-799.

SFHH, 1993. Bilan et recommandations sur les conditions de rejets des effluents liquides desétablissements de santé - Rapport aux Ministères de la santé et de l'environnement. SociétéFrançaise d'Hygiène Hospitalière. Paris: 32p.

Shaw, J.P., Large, A.T., Chipman, J.K., Livingstone, D.R., Peters, L.D., 2000. Seasonal variation in mussel Mytilus edulis digestive gland cytochrome P4501A- and 2Eimmunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay). Marine Environmental Research 50(1-5): 405-409.

Shibutani, S., Shaw, P.M., Suzuki, N., Dasaraghi, L., Duffel, M.W., Terashima, I., 1998. Sulfation of alpha-hydroxytamoxifen catalyzed by human hydroxysteroid sulfotransferase results in tamoxifen-DNA adducts. Carcinogenesis, 19(11), 2007-2011.

Shibutani S, Suzuki N, Laxmi YRS, Schild LJ, Divi RL, Grollman AP, Poirier MC. 2003, Identification of Tamoxifen-DNA Adducts in Monkeys Treated with Tamoxifen Cancer Research 63, 4402–4406.

Shugart, L.R., 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. Ecotoxicology, 9, 329-340.

Shugart, L.R, Theodorakis, C., 1994. Environmental genotoxicity: probing the underlying mechanisms. Environmental Health Perspectives, 102, 13.

Shugart, L.R., 1990. Biomarkers of environmental contamination. Biological monitoring: testing for genotoxicity, 205-216.

Silverman, J.A., 1999. Multidrug-resistance transporters. Pharmaceutical Biotechnology, 12, 353-386.

Simmons, D.L., Xie, W., Chapman, J.G., Evett, G.E., 1991. Multiple cyclooxygenases : cloning of a mitogen-inducible form. In: Prostaglandins, Leukotriens, Lipoxins and PA F, JM Bradley Ed. 67-78, Plenum Press, New York.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175, 184-191.

Sladek, N.E., 1999.Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines.Current Pharmaceutical Design, 5, 607.

Smart, D.J., Chipman,J.K., Hodges,N.J.,2006.Activity of OGG1 variants in the repair of pro-oxidant-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine.DNA Repair, 5(11), 1337-1345.

Sohoni, P., Sumpter, J.P., 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. Journal of Endocrinology, 158, 327-339.

Sonnenschein, C., Soto, A.M., 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1(6), 143-150.

Sorsa, M., Hemminki, K., Vainio, H., 1985.Occupational exposure to anticancer drugs-potential and real hazards. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 154, 135-149.

Springate, J., Zamlauski-Tucker, M.J., Lu, H., Chan, K.K., 1997.Renal clearance of ifosfamide.Drug Metabolism Disposition, 25, 1081.

Sridar, C., Kent, U.M., Notley, L.M., Gillam, E.M.J., Hollenberg, P.F., 2002. Effect of tamoxifen on the enzymatic activity of human cytochrome CYP2B6. Journal of Pharmacologyand Experimental Therapeutics, 301, 945-952.

Stabb, E.V., Butler, M.S., Adin, D.M., 2004. Correlation between osmolarity and luminescence of symbiotic Vibrio fischeri strain ES114. Journal of Bacteriology, 186, 2906-2908.

Steger-Hartmann, T., Kümmerer, K., Hartmann, A., 1997.Biological degradation of CP and its occurrence in sewage Water. Ecotoxicology and Environmental Safety, 36, 174-179.

Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1994. Molecular epizootiology: assessment of exposure to genotoxic compounds in teleosts. Environmental Health Perspectives 102, 19.

Stieger, B., Meier, P.J., 1998. Bile acid and xenobiotic transporters in liver. CurrentOpinion In Cell Biology, 10, 462-467.

Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.D., Rodriguez, S.V., Baumann, W., 1999.Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. The Science of the Total Environment, 225,135-141.

Summerhayes, M., Daniels, S., 2003. Practical Chemotherapy – A Multidisciplinary Guide. Oxford: Radcliffe Medical Press.

Sumpter, J.P., 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 33(1), 9-16.

T

Takahashi, N., Harttig, U., Williams, D. E., and Bailey, G. S.,1996. The model Ah-receptor agonist beta-naphthoflavone inhibits aflatoxin B1-DNA binding in vivo in rainbow trout at dietary levels that do not induce CYP1A enzymes. Carcinogenesis, 17, 79-87.

Tang,J.Y.M., McCarty, S., Glenn, E., Neale, PA, Warne, M.St.J., Escher, B.I., 2013. Mixture effects or organic micropollutants present in water. Towards the development of effect-based water quality baseline toxicity. Water Research, 47, 3300-3314.

Tang,J.Y.M., Aryal,R., Deletic, A., Gernak, WGlenn, E., McCarty, S., Neale, P.A., Warne, M.St.J., Escher, B.I., 2013. Waste water, 47, 5594-5606.

Tannenbaum, S.R., 1997. Comparative metabolism of tamoxifenand DNA adduct formation and in vitro studies on genotoxicity.Seminars inOncololgy, 24, 81-86.

Taub, F.B., 1989.Standardized Aquatic Microcosm.Development and Testing. In: Boudou A., Rybeyre F., Aquatic Ecotoxicology: Fundamentals, Concepts and Methodologies. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2, 47-91.

Ternes, T.A., 1998.Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers.Water Research, 32(11),3245-3260.

Ternes, T.A., Joss, A. (Eds.), 2006.Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances.The Challenge of Micro-pollutants in Urban Water Management. IWA Publishing, London.

Thoumelin, G., 1995. Les tensio-actifs (LAS, APE) dans les eaux douces et marines: Analyse,comportement et écotoxicologie. IFREMER, Repères océan n°9. Plouzané: 113p.

Tjan-Heijnen, V., Manegold, C., Buchholz, D., 1999. Reduction of chemotherapy-induced febrile leukopenia by ciprofloxacin and roxithromycin in small cell lung cancer (SCLC) patients: an EORTC phase III study. Proc. American Society of Clinical Oncology, 18, 469.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental Molecular Mutagenesis, 35, 206-221.

Thomas, K.V., Hilton, M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries.Marine Pollution Bulletin, 49, 436-444.

Trédaniel, J., Zaleman, G., Douriez, E., 1995. Gènes et enzymes impliqués dans lemétabolisme des carcinogènes. Bulletin cancer 82, 77-84.

Truhaut, R., 1975. Ecotoxicology - a new branch of toxicology : a general surve of its aims, methods, and prospect. Ecological Toxicology Research, New York; plenum, 3-24.

Truhaut, R., 1977. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectevies. Ecotoxicology Environment Safetey, 1, 151-173.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Yokoi, T., 2005.Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. Cancer Letters, 227, 115-124.

Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998.Endocrine Disruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence. Critical Review in Toxicology, 28(4), 319-361.

U

Uhl, M.,Helma, C.,Knasmüller, S., 2000.Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells.MutationResearch, 468, 213-225.

V

Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Jr, Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers, J.P., 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocrine Reviews, 33, 378-455.

Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., De Mattia, F., Labra, M., Castiglioni, S., Bracale, M., 2011. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae Pseudokirchneriella subcapitata. Aquatic Toxicology, 101, 459-465.

Varadhachary, G.R., Hoff, P.M., 2005. Front-line therapy for ad-avanced colorectal cancer: Emphasis on chemotherapy. Seminar of Oncology 32(6-9), 40-42.

Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety.Environment International, 28, 711-717.

Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Barcelo, D., 2012.Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. The Science of the Total Environment, 430, 109-118.

Vindimian, E., 2006. Problématique des substances à risque. In: Conférence Eau et Santé. Eaux pluviales etassainissement : nouvelles préoccupations sanitaires, GRAIE, Grand-Lyon et ASTEE.10.10.2006, Lyon-Villeurbanne, 55-73.

Volatier, L., 2004. Réponse d'une communauté périphytique à un effluent complexe : études en bioessais et canaux artificiels. Thèse - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet au LSE del'ENTPE. Vaux en Velin: INSA de Lyon, 303p.

W

Wang, W., 1990.Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52(1),7-22.

Watkinson, A.J., Murby, E.J., Kolpin, D.W., Costanzo, S.D., 2009.The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. Science of the Total Environment, 407, 2711-2723.

Webb, S., Ternes T., Gibert M., Olejniczak, K.,2003.Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water.Toxicological Letters, 142,157-167.

Weigel, S., Kuhlmann, J., Huhnerfuss, H., 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. The Science of the Total Environment, 295,131-141.

Weinstein, I.B., 1988. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. Cancer Research, 48, 4135-4143.

Weisburger, J.H., Williams, G.M., 2000. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. Toxicological Sciences, 57, 4-5.

WHO, 2002.Global assessment of the state of the science of Endocrine diruptors. T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock and G. van Der Kraak. geneva switzerland, World Health Organization - International Programme on chemical safety.

Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., Schmidt, R., Stache,l B., Von Tümpling, W., Wanke, A., 2004.Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. Chemosphere, 57(2),107-126.

Williams, C. S., Mann, M., DuBois, R. N., 1999.The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Oncogene, 18, 7908-7916.

Williams, J.A., Phillips, D.H., 2000. Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. Cancer Research, 60, 4667-4677.

Williams, G.M., Jeffrey, A.M., 2000. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. Regulatory Toxicology And Pharmacology, 32, 283-292.

Willson, T.M., Henke, B.R., Momtahen, T.M., Charifson, P.S., Batchelor, K.W., Lubahn, D.B., Moore, L.B., Oliver, B.B., Sauls, H.R., Triantafillou, J.A., 1994. 3-[4-(1,2-Diphenylbut-1-enyl)phenyl]acrylic acid: a non-steroidal estrogen with functional selectivity for bone over uterus in rats. Journal of Medicinal Chemistry, 37, 1550-1552.

Wolowicz, M., Smolarz, K., SokoÅ‚owski, A., Dame, R.F., Olenin, S., 2005. Neoplasia inEstuarine Bivalves: Effect of Feeding Behaviour and Pollution in the Gulf of Gdansk(Baltic Sea, Poland). Earth and Environmental Series, 47, 165-182.

Wolska, L., Sagajdakow, A., Kuczyńska, A., Namieśnik, J., 2007. Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 26, 332-344.

Wong, C., Chen, S., 2012.The development, application and limitations of breast cancer cell lines to study tamoxifen and aromatase inhibitor resistance. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 131(3-5), 83-92.

Wyckoff, E., Natalie, D.M., Nolan, J.M., Lee, M., Hsieh, T.S., 1989. Structure of the Drosophila DNA topoisomerase-II gene: nucleotide sequence and homology among topoisomerase-II. Journal of Molecular Biolology, 205, 1.

X

Xie, H.J., Broberg, U., Griskevicius, L., Lundgren, S., Carlens, S., Meurling, L., Paul, C., Rane, A., Hassan, M., 2003. Alteration of pharmacokinetics of cyclophosphamide and suppression of the cytochrome P450 genes by ciprofloxacin. Bone Marrow Transplantation, 31, 197-203.

Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., Meng, W., 2014. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewagetreatment plant and its effluent-receiving river.Chemospshere (sous presse).

Y

Yang, Y., Fu, J., Peng, H., Hou, L., Liu, M., Zhou, J.L., 2011. Occurrence and phase distribution of selected pharmaceuticals in the Yangtze Estuary and its coastal zone. Journal of Hazardous Materials, 190(1-3), 588-596.

Yu, L., Waxman, D.J., 1996.Role of cytochrome P450 in oxazaphosphor- ine metabolism.Deactivation via N-dechloroethylation and activation via 4-hydroxylation catalyzed by distinct subsets of rat liver cytochromes P450. Drug Metabolism Disposition, 24, 1254.

Yusuf, A.T., Vian, L., Sabatier, R., Cano, J.P., 2000. In vitro detection of indirect-acting génotoxines in the comet assay using HepG2 cells.Mutation Research, 468, 227-34.

Z

Zamek-Gliszczynski, M.J., Hoffmaster, K.A., Nezasa, K., Tallman, M.N., Brouwer, K.L.R., 2006. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 27, 447-486.

Zanger, U.M., Schwab, M., 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacology & Therapeutics, 138, 103-141.

Zeiler, H.J, Pertersen, U., Gau, W., Ploschke, H.J., 1987. Antibacterial activity of the metabolites of ciprofloxacin and its significance in the bioassay.Arzneimittel-forschung, 37(2), 131-134.

Zegura, B., Heath, E., Cernosa, A., Filipic, M., 2009. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. Chemosphere, 75, 1453-1460.

Zhang, Q.H., Wu, C.F., Duan, L., Yang, J.Y., 2008.Protective effects of total saponins from stem and leaf of Panax ginseng against cyclophosphamide-induced genotoxicity and apoptosis in mouse bone marrow cells and peripheral lymphocyte cells. Food Chemical Toxicology, 46(1), 293-302.

Zhou, R., Treeck, O., Horn, F., Ortmann, O., 2005.Effects of prolonged tamoxifène treatment on receptor expression and apoptosis of ovarian cancer cells. Gynecology Oncology, 96, 678-683.

Zorita, S., Mårtensson, L., Mathiasson, L., 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. Science of the Total Environment, 407, 2760-2770.

Zounkova, R., Kovalova, L., Blaha, L., Dott, W., 2010.Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites.Chemosphere, 81, 253-60.

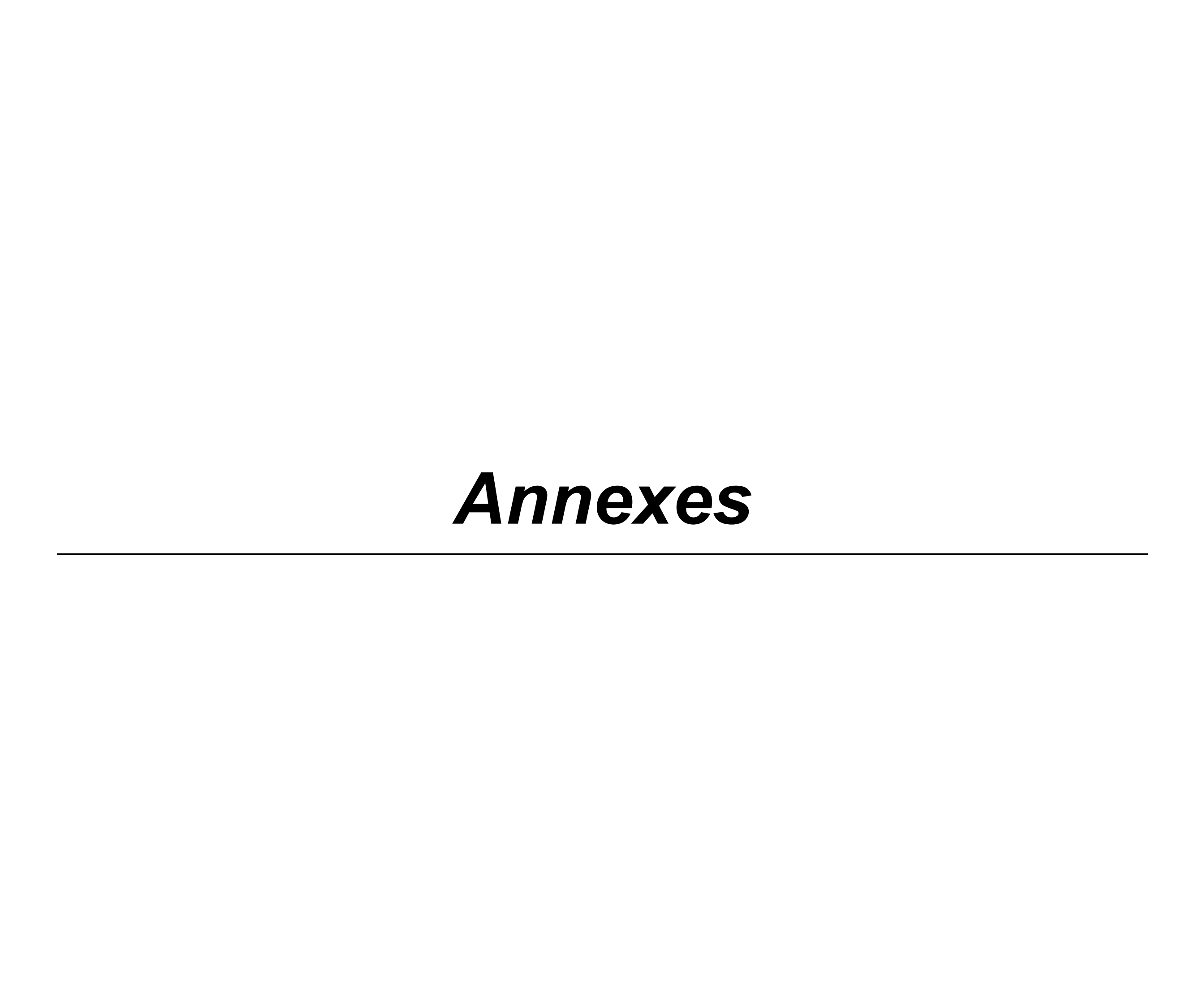
Zounkova, R., Odrá\vska, P., Dole\vzalová, L., Hilscherová, K., Mar\vsálek, B., Bláha, L., 2007. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. Environmental Toxicology and Chemistry, 26, 2208-2214.

Zounkova, R., Hilscherovà, K., Blàha, L., Houloubek, I., 2006.Evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of special (hospital) wastewaters (Poster). In: SETAC Europe. 7-11.05.06.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., 2005.Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. Journal of Hazardous Materials, 122, 205-209.

Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment.Lancet, 355, 1789-1790.

Annexes



■ <u>Préparation du milieu de culture et d'essai pour *Lemna minor*</u>

(Selon la norme AFNOR, NF XP T 90-337, 1996)

Substance	Concentration: Solution mère (g/L)	F.D	Concentration: Milieu[a] (mg/L) de base[b]	Concentration: Milieu[a] (mg/L) de culture et d'inoculation[c]	Élément	Solution mère
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	123,3	x 25	4 932	493,2	n.i.[d]	3
KNO_3	101,1	x 20	5 055	505,5	n.i.	2
$Ca(NO_3) \cdot 4H_2O$	118	x 10	11 800	1 180,0	n.i.	1
KH_2PO_4	68	x 100	680	68,0	n.i.	4
EDTA ferrique	3,46	x 100	34,6	3,46	n.i.	5
H_3BO_3	28,6	x 1000	28,6	2,86	n.i.	6
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	15,5	x 1000	15,5	1,55	n.i.	6
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,2	"	2,2	0,22	n.i.	6
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,79	"	0,79	0,079	n.i.	6
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1,28	"	1,28	0,128	n.i.	7
NH_4VO_3	2,296	"	2,296	0,229 6	n.i.	7
$CrK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0,96	"	0,96	0,096	n.i.	7
$NiSO_4 \cdot 7H_2O$	0,478 5	"	0,478 5	0,047 9	n.i.	7
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,493	"	0,493	0,049 3	n.i.	7
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,179 4	"	0,179 4	0,017 94	n.i.	7
$TiOSO_4 \cdot 4H_2O$	0,241 6	"	0,241 6	0,024 16	n.i.	7
Rajustement du pH	Rajuster le pH des milieux de culture et d'essai à 5,5 ± 0,5 au moyen de NaOH ou de HCl[e].					
Stérilisation	Passer sur un filtre à ouvertures de 0,22 µm.					

[a] Concentration de la substance dans le milieu préparé.
[b] Milieu nutritif concentré, préparé immédiatement avant emploi.
[c] Les milieux de culture et d'essai sont constitués à 10 % de milieu nutritif concentré et à 90 % d'eau distillée ou d'une eau de qualité équivalente.

- Protocole simplifié du test YES/YAS tiré du manuel d'utilisation fournit par la société xenometrix

Jour 1 (vendredi matin): culture des levures

1. Ajouter dans le flacon de milieu basal: les 4 solutions de vitamines, acide L-aspartique, L-Thréonine et sulfate de Cuivre
2. Identifier 2 flasques YES et YAS. Ajouter 5ml de mélange de culture à chaque flasque et y introduire la levure dédiée
3. Bien agiter et placer à 32°C, 100rpm, 2 à 3 jours (week-end)

Jour 2 (lundi matin): préparation des plaques de réaction

1. Inspecter les cultures fongiques. Vérifier que la DO_{690}>0,3
2. Reconstituer chaque substance de référence (RS) par 100µL de DMSO
3. Préparer les échantillons: réaliser des solution stock à 10^{-2}M ou à défaut utiliser la concentration soluble la plus élevée
4. Déballer 5 plaques 96-puits et identifier 4 des plaques ainsi: YES, anti-YES, YAS et anti-YAS
5. Préparer les milieux d'essai dans 3 réservoirs

- Agonistes: **20ml** de mélange de culture + **0,4ml** CRPG
- ➢ Ajouter 100µl à chaque puits des plaques YES et YAS
- YES antagonistes: **10ml** de mélange de culture + **0,2ml** CRPG + **20µl** de solution stock de E_2 (agoniste œstrogénique de référence)
- ➢ Ajouter 100µl à chaque puits de la plaque anti-YES
- YAS antagonistes: **10ml** de mélange de culture + **0,2ml** CRPG + **6µl** de solution stock DHT (agoniste androgénique de référence)
- ➢ Ajouter 100µl à chaque puits de la plaque anti-YAS

6. Préparer la plaque de dilution des RS et échantillons
7. Transférer 2µl de chaque solution en duplicats dans les plaques aux emplacements respectifs
8. Calculer les volumes de solutions fongiques nécessaires et préparer les cultures de réaction: Ajouter respectivement contenant 20ml de milieu basal chacun des volumes calculés

➢ 100µl de culture de réaction dans chaque puits des plaques dédiées

9. Placer à 32°C, 100rpm pour 48h

Jour 3 (mercredi): Lecture et interprétation

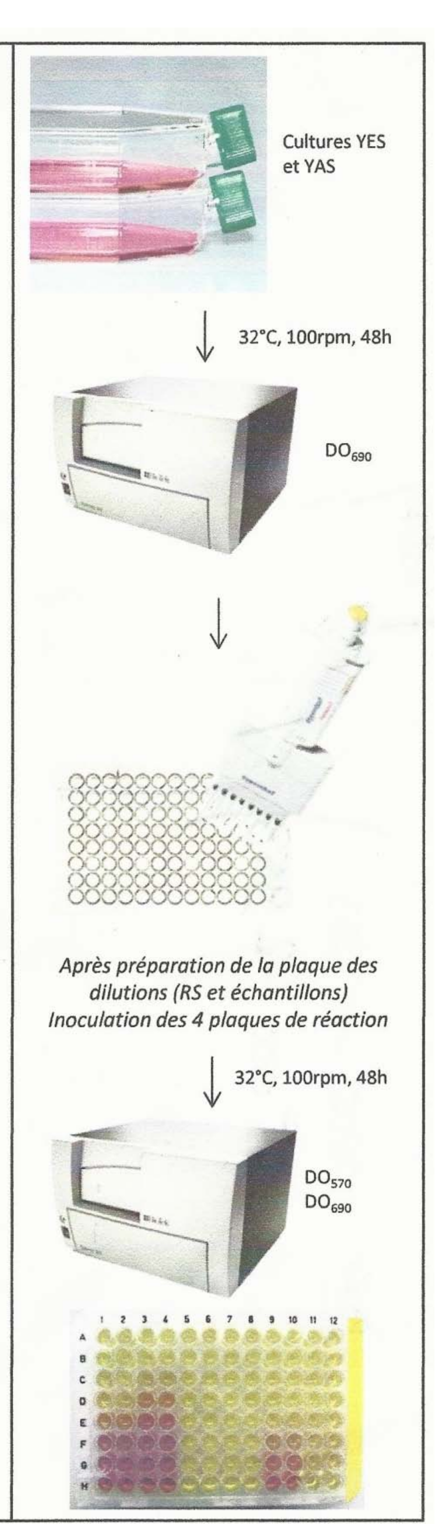
Inspecter les plaques

Lire les DO_{570} et DO_{690} – Reporter les données dans le programme Excel fourni (ou dans votre propre système) et interpréter

En résumé:

Après un week-end de culture fongique :

100µl de milieu de réaction + 2µl d'échantillon + 100µl de culture de réaction → Interprétation après 48h d'incubation.



Article 1 :

In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen ans cyclophosphamide in range of contentrations released in hospital and surface waters.

(Publié)

Environment International 63 (2014) 191–200

Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envint



Full length article

In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water



N. Mater [a,b], F. Geret [d], L. Castillo [e], V. Faucet-Marquis [a,b,1], C. Albasi [a,c], A. Pfohl-Leszkowicz [a,b,*]

[a] Université de Toulouse, Institut National Polytechnique, Laboratoire de Génie Chimique, UMR CNRS/INPT/UPS 5503, France
[b] Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSAT), 1 avenue Agrobiopôle, BP 32607, 31320 Auzeville-Tolosane, France
[c] Ecole National Supérieure des Ingénieurs en Arts chimiques et Technologiques (ENSIACET), 4 allée Emile Monso, 31030 Toulouse cedex 4, France
[d] Université de Toulouse, Laboratoire GEODE, UMR CNRS 5602, Centre Universitaire Jean-François Champollion, Place de Verdun, 81012 Albi cedex 9, France
[e] Veolia Environnement Recherche et Innovation, Centre de Recherche de Maisons Laffitte, 78603 Maisons Laffitte, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 July 2013
Accepted 14 November 2013
Available online xxxx

Keywords:
Ciprofloxacin
Tamoxifen
Cyclophosphamide
Wastewater
Hormesis
Bioassays

ABSTRACT

Ciprofloxacin (CIP), tamoxifen (TAM) and cyclophosphamide (CP) which are often used in anticancer treatment are released in hospital effluent and into the environment. Although the concentrations are low (from ng/L to μg/L), no data exist concerning their ecotoxicological impact. In this study two biomarkers of early effect were performed on hepatic cells (HepG2): cell viability and genotoxicity (DNA breaks) using cell proliferative assay and comet assay, respectively. These data were compared with two standardized ecotoxicological tests: algaltoxkit F™ and microtox®. Cells were exposed to an increasing amount of an individual drug or in a mixture for 24, 48 or 72 h. The time-exposure of bacteria and algae ranged between 5 and 30 min and 72 h, respectively. A non-monotonic dose–response on cell viability was observed when HepG2 cells were exposed to TAM alone or in the presence of CIP. The same scheme was observed with microtox® when the bacteria were exposed to the mixtures. On the other side, an individual drug does not induce any DNA breaks on hepatic cells, whereas a mixture leads to a dose dependent increase of DNA breaks. Similarly a positive response was observed with algaltoxkit F™ only with mixtures. Synergistic effects observed when drugs are in a mixture highlight the importance of investigating the ecotoxicological effects of contaminants at low concentrations and in mixtures.

1. Introduction

All over the world, the number of cancers is in constant progression leading to a dramatic increase of treatments. These treatments are chemotherapy and radiotherapy which can be used combined or not. Chemotherapy is realized by means of anticancer drugs having toxic properties for cells, and of which most are classified in three categories by the International Agency for Research on Cancer (IARC): carcinogenic impact for humans (class 1); likely carcinogenic (class 2); and potentially carcinogenic (class 2B). Cytostatic drugs act on cell growth inhibition or directly kill cells but in an unselective way on both tumoral and healthy cells. Therefore, many antineoplastic agents have cytotoxic, mutagenic, carcinogenic, embryotoxic and/or teratogenic effects. During the treatments, these drugs are eliminated in large proportion under parent compounds or metabolite forms *via* the urine and feces of patients. Hospital effluents which are generally released directly to the sewage network without pretreatment represent an incontestable release source of many bioactive substances used for medical and research purposes such as pharmaceuticals, radioisotopes or solvents (Emmanuel et al., 2005; Verlicchi et al., 2012). Although many of these compounds are removed by adsorption (Carabineiro et al., 2011) or biodegradation in wastewater treatment plants (WWTP), some molecules are directly released into the environment (Besse et al., 2012; Gartiser et al., 1996; Halling-Sørensen et al., 1998; Kuemmerer et al., 1997) where they represent a potential toxic hazard for ecosystems and human health *via* drinking water (Johnson et al., 2008; Rowney et al., 2009; Zegura et al., 2009). Cytostatic agents are mainly found in hospital wastewater, and their use increases by 10% each year. WWTPs can eliminate some cytostatic agents, but the removal rate is not equal between molecules (*e.g.* 25% for cyclophosphamide and 75% for methotrexate) (Catastini et al., 2010). Concentrations of contaminants in potable water are usually in the range from subnanogram/L to μg/L, which is generally below the detection limit of biological assays (Besse et al., 2012). Nevertheless many of them or their metabolites raise considerable toxicological concerns particularly when present as components of complex mixtures (Hernando et al., 2006; Zegura et al., 2009). For example, some endocrine active drugs possess an extremely high biological potency down to the μg/day; therefore it is very likely that they also cause effects at very

* Corresponding author at: Université de Toulouse, Institut National Polytechnique, Laboratoire de Génie Chimique, UMR CNRS/INPT/UPS 5503, France. Tel./fax: +33 534 323 947.
E-mail address: leszkowicz@ensat.fr (A. Pfohl-Leszkowicz).
[1] Present address: Anabiotox, 16 rue Montcalm, 31520 Ramonville-Saint Agne, France.

0160-4120/$ – see front matter
http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.011

low concentrations in the environment. Thus, the contraceptive 17β-ethinylestradiol adversely affects the reproduction of zebrafish (*Danio rerio*) at concentrations as low as 1 ng/L (Wenzel et al., 2001). Data reported by Coe et al. (2008) suggest that exposure to some estrogens at low ng/L concentrations detected in recipient water bodies can even deteriorate the reproductive behavior by alternating mating habits.

The risk posed by cytostatic molecules and by mixtures is still not well documented and it is not possible to conclude on their long-term effects on non-target organisms. Until today, ecotoxicological effects have been assessed by standardized tests or by non specific *in vitro* assays. Such a test however may not suitable for anticancer drugs (Zounkova et al., 2010). Tools to characterize the drug removal process efficiency and to assess the impact of these pollutants on aquatic life and human health must be further developed and refined.

The aim of this paper was to compare potential biomarkers sensitive enough for toxic evaluation of low doses of drugs found in hospital effluents, river or drinking water. We selected three compounds (ciprofloxacin (CIP), cyclophosphamide (CP), tamoxifen (TAM), Fig. 1) frequently used in cancer treatment and found at low doses in hospital wastewater, municipal wastewater treatment plants (WWTPs) and surface water (Hartmann et al., 1998; Thomas and Hilton, 2004; Zuccato et al., 2005). Cyclophosphamide (CP) is primarily used as an anticancer chemotherapeutic but is also used as an immunosuppressive agent in several treatments of arthritis, interstitial pneumonia, *etc.* or during organ transplantation. Tamoxifen (TAM) is a selective estrogen receptor modulator used in breast cancer treatment, which acts as an antagonist competitor in the α-ER1 estrogen receptor (mammary tissues) and like an agonist competitor in cholesterol metabolism (Coezy et al., 1982; Jordan and Koerner, 1975). TAM belongs to compounds put on the prioritization list, due to the potential of this substance to bioaccumulate in the human body and probably in aquatic organisms (Jean et al., 2012). In fish, dose-dependent effects have been reported on the rate of vitellogenin synthesized in males and on sex-ratio disturbance of the population (also dose-dependent) whose parents were exposed to concentrations of tamoxifen higher than 5 μg/L (Liwei et al., 2007). Ciprofloxacin (CIP), which belongs to the fluoroquinolone class, is an antibiotic that inhibits the enzyme activity necessary for replication, transcription, repair and recombination of bacterial DNA (McLellan et al., 1996). This drug is often used against the side effects of treatment protocols, particularly in fever prevention and infections arising after chemotherapy of breast cancer, cancer of the ovaries or the small cell lung cancer (SCLC) (Tjan-Heijnen et al., 2001).

The three drugs can be found in wastewater in the range of 10 ng/L to 10 μg/L for TAM and CP, and 10 ng/L to 100 μg/L for CIP (Lindberg et al., 2004, 2005; Roberts and Thomas, 2006; Thomas and Hilton, 2004; Zorita et al., 2009; Zuccato et al., 2005). As CIP is widely used for therapeutic treatments it is 10-fold more concentrated in hospital effluents and 2-fold more concentrated in municipal WWTP effluents than TAM and CP. Among the fluoroquinolones, ciprofloxacin (CIP) was the most frequently detected in wastewater and surface waters with concentrations of several hundred ng/L (Karthikeyan and Meyer, 2006; Kolpin et al., 2002; Miao et al., 2004). Higher concentrations up to 150 μg/L were even reported in the effluents from hospitals (Martins et al., 2008).

The application of bioassays is an important approach for investigating the causal relationship between exposure to environmental pollutants and the effects on individuals and populations. For example, some microalgae are known to be highly sensitive to the contamination of aquatic environments (Eguchi et al., 2004). Algae play an important role in the equilibrium of aquatic systems where they are involved in nutrient cycling and O_2 production. They therefore form the base of many aquatic food chains; consequently, death of algae will impact aquatic life. They are considered indicators of bioactivity, such as industrial waste, and vary in response to a variety of toxicants (Ma et al., 2006) and reflect chronic aquatic toxicity. On the other hand Microtox® reflects acute aquatic toxicity.

The use of a battery of bioassays in field monitoring has been increasing over the past 15 years (Orias and Perrodin, 2013). Genotoxicity biomarkers are now considered to be an integral part of this approach because exposure to genotoxic agents may exert damage beyond that of individuals and may be detected through several generations (Frenzilli et al., 2009). The Comet assay has already been included in the strategy guidelines for the testing of chemical mutagenicity (EFSA, 2012). The Comet assay was chosen as an indicator test for its sensitivity to detect small amounts of DNA damage, for being flexible and for requiring only small numbers of cells (Tice et al., 2000). Especially the alkaline Comet assay with sperm – a relatively new technique – may become important, as it is very sensitive in assessing genotoxic damage (Baumgartner et al., 2007). The *in vitro* evaluation of DNA damage on cells will help establish feasible, adequate and expedient biomarkers of exposure.

For this reason to be close to the real contamination levels found in waste water, human hepatoma cell line HepG2 has been exposed to the drugs in a range of concentrations from 1 ng/L to 100 μg/L. HepG2 cells have been chosen because they are extensively used for toxicity and genotoxicity evaluation of pure compounds and retained many of the properties of primary liver cells, including the metabolic activation (Lu and Huang, 1994). Owing to their endogenous expression of a variety of xenobiotic metabolizing enzymes, this cell lines are useful for detecting the combined effects of chemicals in a mixture (Mersch-Sundermann et al., 2004; Zegura et al., 2009). Furthermore, it has been widely described that zearalenone (a phytoestrogen) and its metabolites competitively bind to estrogen receptors in different cell models including HepG2 cells (Breithofer et al., 1998). Both viability and genotoxicity revealed by comet assay were evaluated on cells and a comparison was made with two standard tests: microtox® and algaltoxkit F™.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ciprofloxacin (CIP), tamoxifen citrate (TAM), cyclophosphamide (CP) and agarose were obtained from Sigma-Aldrich (France). Cell culture reagents including fetal calf serum and material were obtained from Fisher Scientific (France). The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt

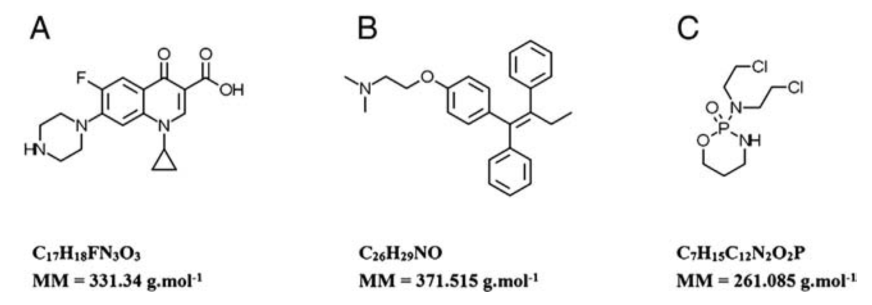


Fig. 1. Chemical structure of ciprofloxacin [CIP] (A), tamoxifen [TAM] (B) and cyclophosphamide [CP] (C).

(MTS) was obtained from Promega (France). All solutions were prepared using ultrapure water.

2.2. Cell culture

The HepG2 cell line (American Type Culture Collection, HB-8065) was cultured in 75-cm^2 polystyrene flasks with minimum essential medium supplemented with 10% heat-inactive fetal bovine serum, 10% L-glutamine (200 mM), 1% penicillin (100 U/mL), 1% streptomycin (100 mg/mL), and 1 mM sodium pyruvate under an atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C. Viable cell count was assessed by Trypan Blue exclusion before toxic evaluation.

2.3. Cell, algae and bacteria treatments

Ciprofloxacin (CIP), tamoxifen citrate (TAM) and cyclophosphamide (CP)) were dissolved in HCl, methanol and water respectively for stock solution and stored at −20 °C. Prior to the treatments, the compounds were diluted in the culture medium in order to give a final solvent concentration below 0.1%. None of these solvents at this dose affected cell viability, bacteria viability, and algae growth.

Hepatic cells (HepG2), algae and bacteria were exposed to increasing concentrations of the respective drugs (CIP, TAM, CP), or to a binary mixture of CIP + TAM or to a mixture of the 3 drugs (CTC) in the range of concentrations found in water as described in Table 1. Conditions 1 and 2 represent low doses close to environmental concentrations (surface water), condition 3 close to WWTP concentrations with a 2-fold factor of CIP, and conditions 4 and 5 represent hospital wastewater concentrations with a 10-fold factor of CIP. In condition 0 cells received only medium. This latter condition corresponds to control.

2.4. MTS cell proliferation assay

The assay was performed in accordance with the method by Barltrop et al. (1991). In brief, cell metabolic activity was determined by monitoring the mitochondrial dependent reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) using a commercial assay (CellTiter 96 AQueous, Promega). Subcultures for experiments were prepared the day preceding in 96-multiwell plates at a density of 5.5×10^3 cells/well and 18 h after plating, the medium was discarded and fresh medium containing drugs individually or in mixtures as described in Table 1 at different concentrations was added. Cells were exposed to drugs during 24 to 72 h then 20 μL of the MTS reagent was added to each well and incubated for 2 h at 37 °C, 5% CO_2. The reduction of MTS was monitored by recording the change in absorbance (A) at 490 nm using the automated Dynex plate reader. The amount of reduced MTS was calculated as a percentage of the absorbance determined by comparison with the standard condition.

$$\text{Percent surviving cells} = \left[A_{\text{test sample}} / A_{\text{control sample}}\right] \times 100.$$

Table 1
Nominal concentrations of drugs used for treatments.

	Unit	Code conditions					
		0	1	2	3	4	5
Drugs (individually)							
CIP	μg/L	0	0.01	0.1	1	10	100
TAM	μg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10
CP	μg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10
Drugs (in mixture)							
CIP	μg/L	0	0.01	0.1	1	10	100
TAM	μg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10
CIP	μg/L	0	0.01	0.1	1	10	100
TAM	μg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10
CP	μg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10

2.5. Alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay

2.5.1. Treatment

Subcultures for experiments were prepared the day preceeding the test. HepG2 cells were plated onto 12-multiwell plates at a density of 1×10^5 cells/well and allowed to attach overnight. The medium was then discarded and replaced by 2 mL of test medium and treated cells and control cells were incubated for 24 h to 72 h.

2.5.2. Slide preparation

The comet assay was performed according to Singh et al. (1988) with minor modifications. All the procedures were conducted in the dark and on ice to minimize spurious sources that might cause DNA damage. Conventional microscope slides were dipped in 1.6% agarose and allowed to dry on a flat surface at room temperature before the experiment. The first layer with a 0.8% normal melting point (NMP) in PBS (phosphate saline buffer containing NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 4.3 mM, KH_2PO_4 1.47 mM, pH 7.4) kept at 37 °C was added onto frosted slides and gently covered with a cover-slide. The cell pellet obtained by centrifugation for 5 min at 4 °C, 4000 rpm, was resuspended in 150 μL to a final cell-agarose solution containing approximately 5×10^4 cells in 0.5% low melting point (LMP) agarose in PBS and 75 μL was added as the second layer onto duplicate slides. The third layer (75 μL 0.5% LMP agarose) was added and the slides were placed in fresh lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na_2, 10 mM Tris, pH 10; 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) at 4 °C for 1 h. The slides were transferred on a horizontal electrophoresis tray and submerged in denaturation buffer (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH 13) for 20 min. Electrophoresis was carried out using the same solution for 20 min at 26 V and 350 mA (0.8 V/cm) then the slides were gently washed three times for 5 min in a cold neutralizing buffer (400 mM Tris, pH 7.4). Slides were dried in methanol and stored in a low humidity environment until analysis.

2.5.3. Slide analysis

Few minutes before analysis, 50 μL of ethidium bromide (40 μg/mL) was dropped onto the agarose and covered with a coverslip. Fifty cells per slide were randomly scored at 250× magnification with an Olympus BX50 fluorescence microscope equipped with an excitation filter of 515–560 nm and a barrier filter of 590 nm. DNA damage was quantified by tail DNA and median values were calculated by a Komet 5.5 image analysis system (ANDOR Technology, Belfast, UK).

Positive control was run using ethyl-methanesulfonate (EMS).

2.6. Algaltoxkit F™ assay: Selenastrum capricornutum

The growth inhibition of green algae *S. capricornutum* bioassays from MicroBioTests Inc. (Gent, Belgium) was performed following the standard operational procedures of algaltoxkit F™ (1996). This test was conducted in accordance with OECD Guideline 201 (2002). Tests were carried out with *S. capricornutum* obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), Argyll, Scotland. All microalgae growth inhibition tests were conducted at 25 °C with continuous illumination of 10,000 lx.

The algaltoxkit technology is based on the (rapid) measurement of the optical density (OD) of 25 mL algal cell suspensions in disposable spectrophotometric cells of 10 cm path length, called "long cells". Negative controls were incorporated for each test containing only algal growth media and algal inoculum. The initial algal density was 1×10^4 cells/mL and the density of each replicate was measured at 670 nm after 72 h using a spectrophotometer. Average of specific growth and percentage of inhibition for each concentration were calculated by comparison with standard condition. Test validity criteria required algal growth in control flasks to increase by a factor of 16 within the 72 h test period and pH not to have varied by more than 1.5 units relative to the initial pH in the growth medium. The reference chemical

potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) was employed as a positive control to ensure the validity of the test method.

2.7. Microtox® assay: Vibrio fischeri

Microtox® Reagent (*V. fischeri* NRRL-B 11177) from AZUR Environmental (Carlsbad, CA, USA) was reconstituted and bacteria were cultured, harvested and frozen in cryoprotectant. Bioluminescence inhibition was evaluated using the basic test protocol and was determined at 5-, 15-, and 30-min intervals (Azur Environmental, 1998). The thawed bacterial suspension was used for the toxicity tests. The number of viable bacteria in the photobacterial luminescence inhibition tests was ~10^6 bacteria per mL of test solution, and the toxicity testing was performed at 15 °C. The measurements were made by using a 1253 Luminometer (Labsystems, Helsinki, Finland) connected to a personal computer and the calculation of inhibitory % was performed by means of standard software (Labsystems, Helsinki, Finland). A basic test was also conducted with the reference standard phenol for each fresh vial of bacteria opened to ensure the validity of the test method.

2.8. Statistical analysis

All experiments were independently performed three times under the same conditions and results were calculated in median values with standard deviation (SD). As the distribution of cell viability and SCGE assays deviated from normality, data following the Kruskal–Wallis test, a non-parametric analog of the Dunnett's procedure for multiple comparisons was used. Values were considered significant (*) at $p < 0.05$ and (**) at $p < 0.01$.

The statistical significance of values from standardized bioassays (microtox®; algaltoxkit F™) was checked using a one-way analysis of variance ANOVA test using Statistica 9.0 package software. Post-hoc comparisons between control and samples were made using Fisher's test to determine which values significantly differed at $p < 0.05$ (*).

2.9. Interaction analysis

To address the interaction of binary (CIP + TAM) or ternary mixtures (CIP + TAM + CP) the effects were compared to the expected effects that were calculated from single compound toxicity obtained in the same experiments. The two reference model of concentration addition (CA) and the independent action (IA) were used to derive patterns of joint effects of mixture (Chou, 2006, 2011). If the interaction is strictly additive $[1 - E(Ca)] \times [1 - E(Cb)] = 1 - E(Cmix)$, where E(Ca) is the effect induced by the compound a alone; E(Cb) the effect induced by the compound b alone and E(C mix) is the effect observed when the compounds are mixed. In other word if the ratio expected value (E)/observed value (O) = 1 the interaction is strictly additive, if ratio > 1, the interaction is synergistic and when the ratio < 1 the interaction is antagonistic.

3. Results

3.1. HepG2 cell viability

Viability of HepG2 cells after exposure to drugs alone or mixed was detected by the MTS cell proliferation assay. The data (Figs. 2 and 3) are expressed as percentage of viable cells compared to non-exposed cells. Each value corresponds to the median value of 15 measurements (3 experiments, five replicates). Whatever the exposure time of hepatic cells to CP, a slight but significant ($p < 0.05$) decrease of cell viability was only observed with the highest dose tested (10 μg/L) (Fig. 2A and B). Exposure of cells to the lowest concentration (10 ng/L) of CIP or TAM significantly ($p < 0.01$) reduced cell viability (Fig. 2A) and the inhibition was time dependent (Fig. 2B). With higher doses of CIP (100 ng/L–10 μg/L), the cytotoxicity is lower than with 10 ng/L and was not dose dependent. Exposure to a ten-fold higher concentration of CIP (100 μg/L), significantly ($p < 0.01$) decreases the cell viability. The percentages of viable cells exposed to 100 μg/L of CIP were 90% and 80% respectively after 24 and 72 h of exposure. When cells are exposed to TAM whatever the time of exposure a U-shaped dose–response curve was observed.

Fig. 3 shows the combined effects of CIP + TAM or of the three drugs (CTC) on HepG2 cell viability. The concentrations of exposure are described in Table 1 (*cf.* Section 2.3). Whatever the length of cell exposure to CIP + TAM a U-shaped dose–response curve was observed.

The inhibition of cell growth is lower than expected if a strictly additive effect will occur (Table 2). When CP was added in the mixture the antagonistic effect was higher compared to a binary mixture, with almost no more impact on cell viability. Whatever the relative concentrations, the type of mixture (binary or ternary mixture) and the time of exposure, the E/O ratio was always < 1 indicating that an antagonistic effect occurs when the drug are present together, even at very low doses (Table 2). The antagonism is higher in the presence of CP compared to CIP + TAM (Fig. 4).

3.2. DNA damage on HepG2 cells

The genotoxic effect of the three drugs on HepG2 was tested by analysis of DNA single strand break formation using the comet assay. In the range of concentrations tested (10 ng/L–10 μg/L) exposure of cells to individual compounds did not induce any DNA damage, whatever the exposure time (Fig. 5). Even exposure of cells to 10 more CIP concentration did not induce any DNA breaks.

Simultaneous exposure to increasing concentrations of the three drugs, whatever the time of exposure, significantly increased DNA damages (Fig. 6). DNA breaks are two folds higher when cells are exposed to 10 μg/L of CP + 10 μg/L TAM + 100 μg/L CIP compared to 10 μg/L TAM + 100 μg/L CIP (condition 5; Fig. 5A). The increase of DNA damage was dose dependent when the three drugs are present simultaneously (Fig. 6) and was significantly higher compared to exposure to binary mixture. Although DNA breaks decreased with the time of exposure,

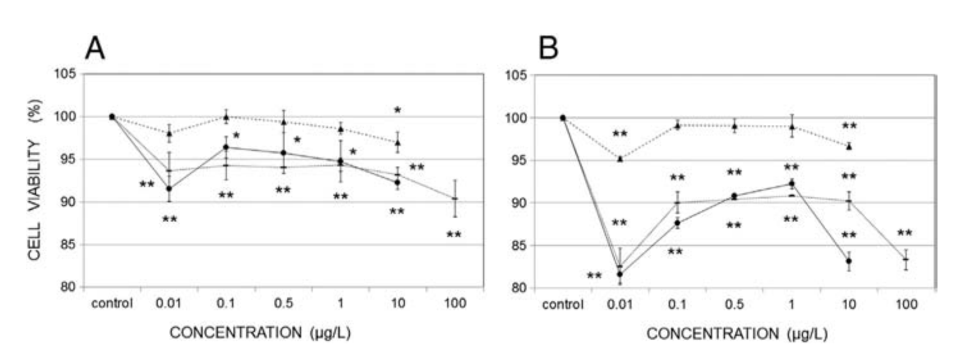


Fig. 2. Survival rate of HepG2 cells exposed to CP (▲); CiP) (–); TAM) (♦); during 24 h (A) to 72 h (B). Results are expressed as median value ± SD of the percentage of viable cells compared to control condition. Statistically significant at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) compared to control cell.

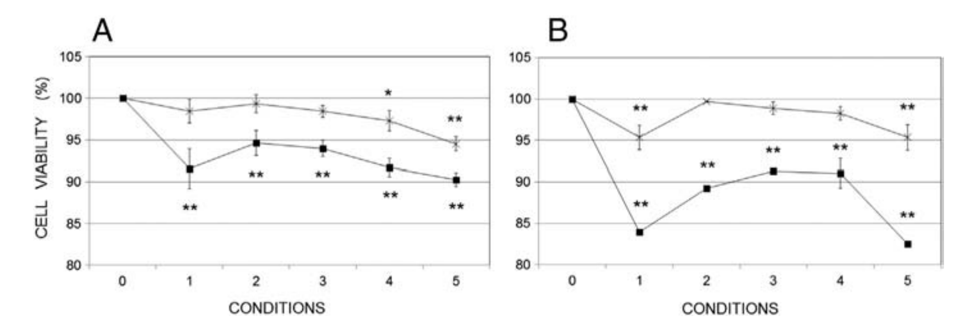


Fig. 3. Survival rate of HepG2 cells exposed to CIP + TAM ( ); CTC (⁎); during 24 h (A) to 72 h (B). The numbers 0–5 refer to the mixture condition described in the M & M part (Table 1). Results are expressed as median value ± SD of the percentage of viable cells compared to control (condition 0). Statistically significant at p < 0.05 (*) and p < 0.01 (**) compared to control cell.

even after 72 h, the amount of DNA damages observed when the cells are exposed to the three drugs is significantly higher ($p < 0.01$) compared to treatment with CIP + TAM (Fig. 6B) and compared to control.

3.3. Growth inhibition of microalgae *S. capricornutum*

TAM significantly ($p < 0.05$) stimulated the growth of microalgae (Fig. 7). CIP has no effect on microalgae. The dose effect induced by CP exhibited a U-shape form. With the lowest dose a slight but significant inhibition of algae growth was observed ($p < 0.05$); the highest CP dose tested induced a proliferation.

When microalgae were exposed to the mixture (CIP + TAM or CTC) whatever the exposure time, the algae growth was dose-dependently inhibited (Fig. 8). There is no difference between exposure to binary mixture (CIP + TAM) compared to mixture of the three drugs.

3.4. Extinction of bioluminescence of bacteria *V. fischeri*

Except with CIP at the highest dose (100 μg/L), none of these drugs inhibited *V. fischeri* bioluminescence (Fig. 9).

In contrast, exposure of bacteria to the mixture induced a non-monotone dose–response (U-shape curve), mainly with CIP + TAM (Fig. 10). The addition of CP in the mixture induced an antagonist effect. For the lowest doses in the mixture, the inhibition of bacteria bioluminescence was much higher when the three drugs were present compared to only CIP + TAM. For the other conditions, the inhibitions were lower in the presence of the three drugs compared to CIP + TAM (Fig. 10).

4. Discussion

Recent studies show that among many environmental contaminants, pharmaceutical and personal care product (PPCP) residues in the environment are of emerging concern. Cytostatic drugs and human metabolites are directly discharged into the sewage system without any specific control after being administered in the hospitals. Household discharge by out-patients presents another pathway of cytostatics to the environment (Bound and Voulvoulis, 2006). Due to their highly potent mechanism of action (cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and teratogenicity), cytostatic drugs could induce adverse effects on any growing eukaryotic organism and bacteria (Besse et al., 2012; Johnson et al., 2008). Another point is also the deleterious effects of these drugs for the hospital staff (Bouraoui et al., 2011; Burgaz et al., 1999, 2002; Fucic et al., 1998).

In fact, some cytostatics have been detected in hospital wastewaters and even influent wastewaters at concentrations ranging from ng/L to μg/L (Buerge et al., 2006; Johnson et al., 2008; Negreira et al., 2013a, 2013b; Rowney et al., 2009). Although environmental concentrations are below human therapeutic doses, the persistent release of these drugs may lead to chronic effects at low concentration.

Mass fluxes alone are insufficient to evaluate the risk stemming from pharmaceuticals; their ecotoxic potential needs to be considered. Despite recent large efforts to increase the database on ecotoxicological effects of pharmaceuticals (PhACT Database, 2006), the implications of chronic low dose exposure of aquatic fauna and humans to environmental discharge of these drugs remain largely unknown (Crane et al., 2006). The lack of chronic toxicity data for drugs hinders the ability to predict effects. In addition, using only physico-chemical analysis, it is impossible to predict the toxic and/or genotoxic properties of complex

Table 2
Comparison between expected additive values and results obtained in percentage (%) from HepG2 cell exposed during 24 h (A) and 72 h (B) to CIP + TAM and CTC. E/O is the ratio between expected values (E) compared to observed values (O).

Drugs (in mixture)	Condition				
	1	2	3	4	5
A.					
CIP + TAM	91.52 ± 2.39	94.64 ± 1.51	93.97 ± 0.96	91.67 ± 1.09	90.23 ± 0.80
CIP + $TAM_{exp.}$	85.71	90.88	90.35	88.34	83.43
E/O	0.94	0.96	0.96	0.96	0.92
CTC	98.57 ± 1.42	99.34 ± 1.10	98.44 ± 0.73	97.28 ± 1.21	94.52 ± 0.87
$CTC_{exp.}$	84.04	90.91	89.84	87.14	80.94
E/O	0.85	0.92	0.91	0.90	0.86
B.					
CIP + TAM	83.93 ± 0.11	89.22 ± 0.15	91.29 ± 0.38	91.03 ± 1.77	82.51 ± 0.18
CIP + $TAM_{exp.}$	67.34	78.92	82.51	83.19	69.24
E/O	0.780	0.88	0.90	0.91	0.81
CTC	95.33 ± 1.46	99.72 ± 0.07	98.87 ± 0.78	98.24 ± 0.82	95.36 ± 1.54
$CTC_{exp.}$	64.12	78.26	81.72	82.38	66.91
E/O	0.67	0.78	0.83	0.84	0.70

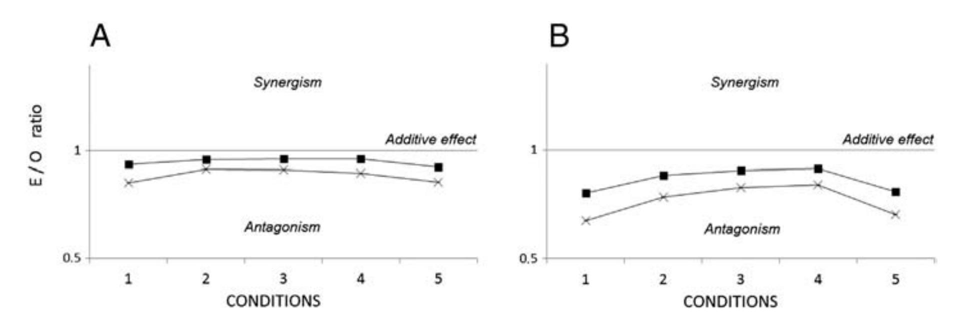


Fig. 4. Drug combination plot. Ratio expected (E)/observed (O) *versus* concentration. CIP + TAM ( ); CTC (⁎), at 24 h (A) and 72 h (B).

water samples, especially if synergistic, antagonistic or potentiating effects between the components occur.

Our study focused on the cytotoxic and genotoxic effects of three drugs, from different chemical classes (ciprofloxacin (CIP), a fluoroquinolone antibiotic; cyclophosphamide (CP), a neoplastic chlorinated compound; tamoxifen (TAM), an estrogenic compound used as an anticancer agent). Considering that these drugs can co-occur in water, the toxic effects of mixtures (CIP + TAM and CTC) where compared to their individual effects.

Toxicology has long been dominated by an emphasis on very high doses and the assessment of toxic responses. In comparison with human health risk assessment, ecological risk assessment is poorly understood. In the environment, it is important to know what happens with a low dose, corresponding to real water contamination. The concentrations chosen were based on the range reported in the literature, although the concentrations of PPCPs vary at each site with pharmaceutical usage patterns, the size of the surrounding population, the specific wastewater treatment available, and the discharge location. Thus, the concentrations are not meant to be an exact match to what is found at one municipal wastewater treatment plant, or field site, but to represent concentrations that are environmentally reasonable. The high concentration tested was near the highest reported concentrations found in hospital wastewater up to 150 μg/L (Martins et al., 2008; Negreira et al., 2013a, 2013b; Santos et al., 2013).

Table 3 summarized and compared the four bioassays.

In the range of doses tested (ng/L–10 μg/L), the dose–response of cell viability observed after exposure of HepG2 cells to TAM, CIP and CP, mainly after 72 h of exposure, exhibited a U-shape. This type of curve was also observed when microalgae were exposed to CP. These kinds of non-linear dose–response relationships are referred to hormetic responses and have been described across a wide range of organisms (from bacteria to vertebrates), in response to exposure to at least 1000 different chemicals and environmental stressors. Hormesis is connected with both acclimation and phenotypic plasticity, and may play an important role in allowing animals to adjust to changing environments (Costantini et al., 2010). Deviations from linearity are favored by the occurrence of multiple concurrent and sequential events in toxicological responses. Mechanisms contributing to hormetic responses at low doses included overcompensation to a disruption in homeostasis; adaptive responses based on inducible repair processes; interactions among cell proliferation, cell-cycle delay, apoptosis, and DNA damage; enhancement of gap junction intercellular communication at low doses but inhibition at high doses; *etc.* (for a review see Hoffmann, 2009). Hormesis is a biphasic dose–response that often results from the actions of partial agonists and partial antagonists. TAM is an endocrine disruptor due to its agonist and antagonist effect on estrogen receptor (Coezy et al., 1982; Vandenberg et al., 2012). The low dose stimulating hormetic responses could lead to undesirable effects *e.g.* proliferation of harmful bacteria (Randall et al., 1947) or enhancement of proliferation of tumor cells by antitumor drugs (Calabrese, 2005, 2013). In the case of chemotherapeutic agents, the low dose stimulation appears to reflect an adaptive response to tumor tissue. To address the interaction of binary (CIP + TAM) or ternary mixtures (CIP + TAM + CP) the effects were compared to the expected effects that were calculated from single toxin toxicity obtained in the same experiments. The two reference models of concentration addition (CA) and the independent action (IA) were used to derive patterns of joint effects of mixture (Chou, 2006, 2011). The CA model assumes that mixed chemicals have the same mode of action (MoA), whereas the IA model is based on the idea of a dissimilar action of mixture components, usually to answer the question whether the probability of toxicity from exposure to no chemical is independent from the probability to another chemical (Altenburger et al., 2003; Jonker et al., 2004, 2005).

Data modeling allowed us to infer that all three toxins exerted interactive effects in HepG2 cell viability; bacteria viability (microtox®); algae proliferation (algaltoxkit F™) and genotoxicity (comet assay). A U-shape dose–response was observed for the cell viability test and microtox® test with both kinds for the mixture. Both of these latter tests reflect a mainly acute toxic effect. The application of the CA model showed that the observed cytotoxic effects were lower than expected, and an antagonistic pattern was identified.

Concerning the algaltoxkit F™ test and the comet assay, reflecting a chronic toxic effect, both mixtures have a synergistic effect. While individually, the three drugs would not be expected to cause DNA breaks or inhibition of algae growth at these low doses, the drugs in the mixture lead to a dose-dependent increase of effects. In general these effects are more pronounced after a 72 h exposure compared to lower exposure time confirming a chronic effect, and an adaptive mechanism.

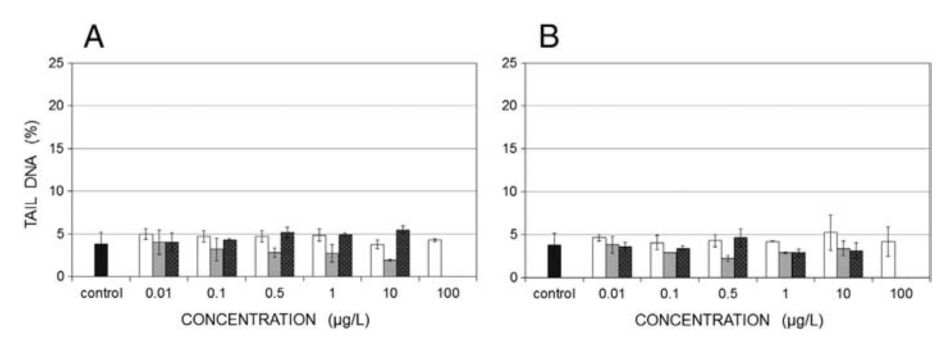


Fig. 5. Comparison of DNA breaks induced on HepG2 exposed to CIP (white), TAM (gray) or CP (black) during 24 h (A) to 72 h (B). The data are expressed as median value ± SD.

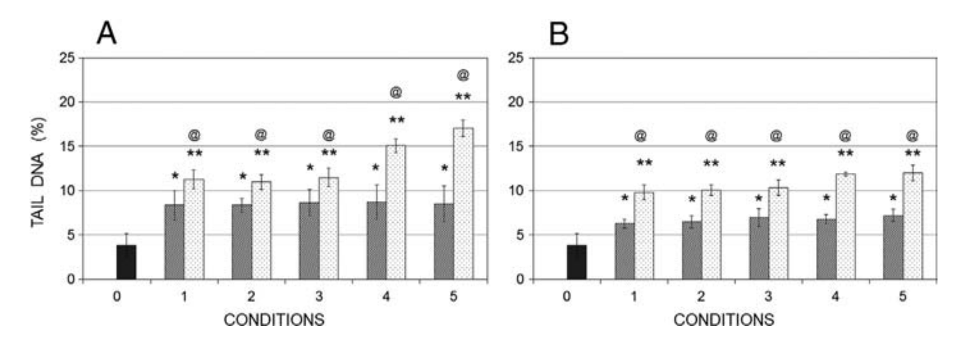


Fig. 6. Comparison of DNA breaks induced on HepG2 exposed to CIP + TAM (hatched) or CTC (stippling) during 24 h (A) to 72 h (B). The data are expressed as median value ± SD. The numbers 1 to 5 refer to the mixture conditions explained in the M & M part (Table 1). Statistically significant at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) compared to control cell; @ significant difference between exposure to three drugs (CTC) compared to CIP + TAM.

This is in line of the data obtained by Yusuf et al. (2000), even though the doses used in their study were much higher.

The evidence suggests that if one measures biological effects too early, the response may appear to fit a threshold or linear model rather than hormesis because insufficient time has elapsed for the requisite gene expression for an adaptive response. If one makes measurements too late, the system may have already returned from the induced state to the ground state.

Comparison between impact of both mixtures (CIP + TAM *versus* CTC) shows that CP increased the antagonistic effect on cell viability and bacteria bioluminescence; and the synergistic effect on DNA breaks formation (comet assay). These data show clearly that the three drugs have a different mode of action. In the case of binary mixture TAM + CIP, interaction could be due to the impact of TAM on membrane efflux. Indeed, Darvari and Boroujerdi (2004) showed that tamoxifen biphasically modulated the membrane efflux of doxorubicin (an antibiotic like CIP). For all the three drugs the interaction could be due to interference on biotransforming enzymes. Tamoxifen must be activated by the cytochrome P450 system to exert its effects *via* anti-estrogenic metabolites that are more potent than the parent compound (Coezy et al., 1982). The main metabolites of tamoxifen are N-desmethyltamoxifen (formed by CYP3A), and 4-hydroxytamoxifen and endoxifen (formed by CYP2D6) (Desta et al., 2004). CP is not cytotoxic by itself but undergoes activation through a metabolic step *in vivo*. Numerous metabolites are known (Kerbusch et al., 2001) and the major ones are chloroacetaldehyde, acrolein and 4-hydroxycyclophosphamide produced by the mixed function of cytochrome P450 oxidase (CYP) present in hepatic microsomes (Huang et al., 2000). The active metabolite (4-hydroxy derivative) is produced mainly by CYP2B6. These metabolites are excreted in the urine. N-dechloroethylation results in inactivation of anticancer activity of CP and formation of the toxic byproduct chloroacetaldehyde. This reaction is catalyzed by CYP3A4. Induction or inhibition of CYP activity mediated by concomitantly administered drugs can change the balance between the activating and inactivating metabolic pathways of cyclophosphamide (Scripture et al., 2005). Ciprofloxacin is an inhibitor of cytochrome P450 3A activity *in vitro* and *in vivo* (Xie et al., 2003). Ciprofloxacin inhibits the CYP which mediates CP biotransformation leading to reduction in the metabolic ratio and a decrease in the levels of active 4-OH-CP. The immunosuppressive effect of CP is hampered by ciprofloxacin, which is detrimental to the treatment, explaining that treatment did not anymore combine these two drugs. In the same way, TAM and its metabolites N-desmethyltamoxifen and 4-hydroxytamoxifen inhibit metabolism mediated by CYP 2B6, 2C9 and 2D6 (Sridar et al., 2002) but increased CYP3A4 (Desai et al., 2002; Sane et al., 2008) and have the potential to cause drug interactions (Scripture et al., 2005). Altogether, modifications of the metabolic pathway lead in the enhancement of the formation of genotoxic metabolites of CP such acrolein. The dG-acrolein adduct has been reported to be considerably more mutagenic in mammalian cells than in *Escherichia coli*. Mammalian polymerase has been reported to bypass the dG-acrolein lesion in the presence of proliferating cell nuclear antigen (Kanuri et al., 2002).

To confirm the link between DNA adduct formations and DNA breaks (comet assay) experiments are underway in our laboratory, DNA breaks can reflect two different events, either a direct attack of DNA or the reparation of DNA damaged by a bulky adduct. In general after repair cells will proliferate, whereas after DNA damage and inaccurate repair cells can die.

5. Conclusion

Only a battery-based approach, including in one hand biomarkers and on other hand an acute and chronic aquatic toxic test on whole organisms, investigating the causal relationship between exposures and environmental pollutants will aid to assess water quality. Two

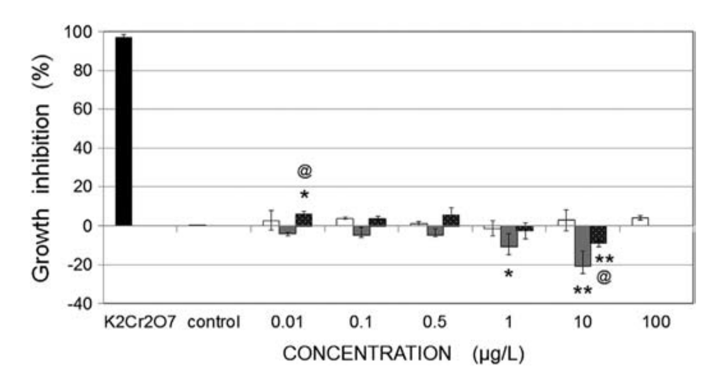


Fig. 7. Growth inhibition of microalgae exposed 72 h to ciprofloxacin (CIP, white); tamoxifen (TAM, gray); and cyclophosphamide (CP, black). $K_2Cr_2O_7$ corresponds to the positive control. Results are expressed as median value ± SD of the percentage of viable algae compared to control condition. Statistically significant at $p < 0.05$ (*) compared to control algae without any treatment.

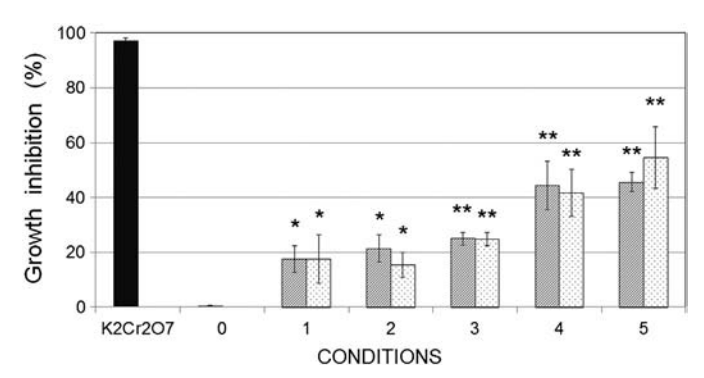


Fig. 8. Comparison of microalgae growth inhibition induced by exposure to CIP + TAM (hatched) or CTC (stippling) during 72 h. The data are expressed as median value ± SD. The numbers 1 to 5 refer to the mixture conditions explained in the M & M part (Table 1).

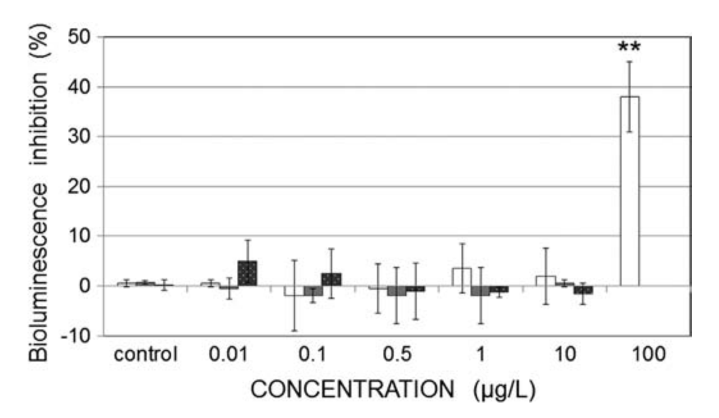


Fig. 9. Bioluminescence inhibition of bacteria exposed to ciprofloxacin (CIP, white); tamoxifen (TAM, gray); and cyclophosphamide (CP, black). Results are expressed as median value ± SD of the percentage of inhibition compared to control condition. Statistically significant at $p < 0.05$ (*) compared to control algae without any treatment.

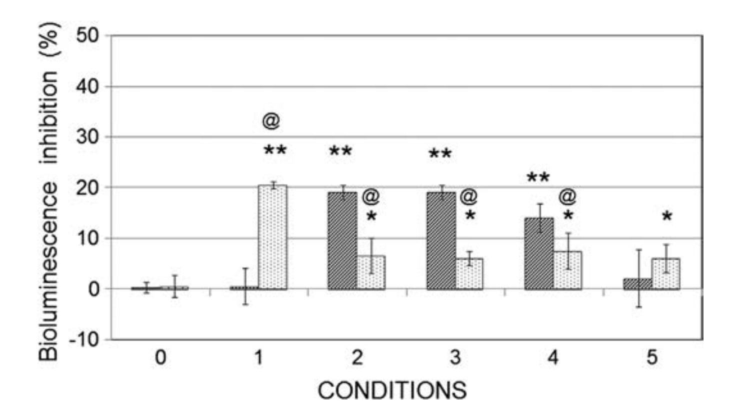


Fig. 10. Comparison of bioluminescence inhibition induced by exposure to CIP-TAM (hatched) or CTC (stippling). The numbers 1 to 5 refer to the mixture conditions explained in the M & M part (Table 1). Results are expressed as median value ± SD of the percentage of viable bacteria compared to control (condition 0). Statistically significant at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) compared to control; @ significant difference between exposure to three drugs (CTC) compared to CIP + TAM.

endpoints (cell viability and microtox®) reflect the acute toxic effect and give similar responses. The two other endpoints (DNA breaks and algaltoxkit F™) reflect a chronic effect, and the adaptive response of organisms.

The results of the mixture experiments demonstrate that chemicals in real water samples act together in mixtures and how not only the absolute concentrations of the mixture components are important but also their contribution to the mixture effect. Throughout this study we identified significant hormetic responses with the cell viability tests and algaltoxkit F™ test at low concentrations of drugs. The hormesis phenomenon is characterized by low dose stimulation of the test species over the control and high dose enhancement of adverse effects. These data pinpoint the difficulties of risk assessment to low concentration (subnanograms) exposure and confirm the data obtained by Hernando et al. (2006) and Zegura et al. (2009). Consequently, while individually these drugs would not be expected to cause acute toxicity in environmental conditions, this study revealed that chronic endpoints were a lot more sensitive than acute endpoints, notably when the drugs occurred simultaneously, and hence further research is needed to investigate chronic effects at environmentally relevant concentrations and in mixtures. The synergism/antagonism observed in the present study demonstrated the necessity to investigate the ecotoxicological effects of contaminants at low concentration mixtures and at different time-exposures.

Cell culture can offer several advantages over whole animal (or organism) studies, *e.g.*, reduced labor, sample volume, variability and at least reduced cost.

Acknowledgment

This paper was prepared with financial support by the French National Research Agency, in the framework of the 2010 "CD2I" call program, within the project "PANACEE" and by the French company. The authors thank G.M. for English proofreading. The authors declare that there are no conflicts of interests.

References

Altenburger R, Nendza M, Schüürmann G. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure–activity relationships. Environ Toxicol Chem 2003;22:1900–15.
Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG. 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. Bioorg Med Chem Lett 1991;1:611–4.
Baumgartner A, Cemeli E, Anderson D. The comet assay in male reproductive toxicology. Cell Biol Toxicol 2007;25:81–98.
Besse J-P, Latour J-F, Garric J. Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? Environ Int 2012;39:73–86.
Bound JP, Voulvoulis N. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: implications for risk assessment. Water Res 2006;40:2885–92.
Bouraoui S, Brahem A, Tabka F, Mrizek N, Saad A, Elghezal H. Assessment of chromosomal aberrations, micronuclei and proliferation rate index in peripheral lymphocytes from Tunisian nurses handling cytotoxic drugs. Environ Toxicol Pharmacol 2011;31:250–7.
Breithofer A, Graumann K, Scicchitano MS, Karathanasis SK, Butt TR, Jungbauer A. Regulation of human estrogen receptor by phytoestrogens in yeast and human cells. J Steroid Biochem Mol Biol 1998;67:421–9.

Table 3
Comparison of the four bioassays reflecting acute effect (cell or bacteria viability) or chronic effect (DNA damages or algae growth inhibition).

Bioassay	Cell viability (MTS)	DNA break (COMET)	Algae growth inhibition (algaltoxkit F™)	Bacteria activity (microtox®
CIP (alone)	Hormesis/inhibition	–	–	– (except inhibition wih high dose)
TAM (alone)	Hormesis/inhibition	–	proliferation	–
CP (alone)	= (Inhibition high dose)	–	Hormesis (inhibition followed by proliferation)	–
CIP + TAM	Hormesis/antagonism	+ (synergy)	inhibition	Hormesis/synergy
CTC	Hormesis/antagonism (almost return to basal level)	++ (synergy)	inhibition	Hormesis/antagonism*
Comment	Effects more pronounced after 72 h exposure.	Effects less pronounced after 72 h exposure. Reflect repair system, and chronic effect	Reflect chronic aquatic effect	Inhibition of bacteria luminescence by CIP could be explained by its antibiotic activity. *Comparison between the two mixtures condition shows an antagonist effect. Reflect acute aquatic effect

CIP = ciprofloxacine; TAM = tamoxifen; CP = cyclophosphamid; CTC = mixture of CIP + TAM + CP.

Buerge IJ, Buser H-R, Poiger T, Müller MD. Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. Environ Sci Technol 2006;40:7242–50.
Burgaz S, Karahalil B, Bayrak P, Taşkin L, Yavuzaslan F, Bökesoy I, et al. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. Mutat Res 1999;439:97–104.
Burgaz S, Karahalil B, Canhi Z, Terzioglu F, Ançel G, Anzion RBM, et al. Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to antineoplastics by the analysis of chromosomal aberrations. Hum Exp Toxicol 2002;21:129–35.
Calabrese EJ. Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. Crit Rev Toxicol 2005;35:463–582.
Calabrese EJ. Hormesis once marginalized, evidence now supports hormesis as the most fundamental dose response. In: Mattson MP, Calabrese EJ, editors. Hormesis. Springer science + Business Media; 2013. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-495-1_2.
Carabineiro SAC, Thavorn-Amornsri T, Pereira MFR, Figueiredo JL. Adsorption of ciprofloxacin on surface-modified carbon materials. Water Res 2011;45:4583–91.
Catastini C, Mullot J-U, Boukari S, Mazellier P, Levi Y, Cervantes P, et al. Identification de molécules anticancéreuses dans les effluents hospitaliers. Eur J Water Qual 2010;39:171–80.
Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev 2006;58:621–81.
Chou T-C. The mass-action law based algorithm for cost-effective approach for cancer drug discovery and development. Am J Cancer Res 2011;1:925.
Coe TS, Hamilton PB, Hodgson D, Paull GC, Stevens JR, Sumner K, et al. An environmental estrogen alters reproductive hierarchies, disrupting sexual selection in group-spawning fish. Environ Sci Technol 2008;42:5020–5.
Coezy E, Borgna J-L, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. Cancer Res 1982;42:317–23.
Costantini D, Metcalfe NB, Monaghan P. Ecological processes in a hormetic framework. Ecol Lett 2010;13:1435–47.
Crane M, Watts C, Boucard T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. Sci Total Environ 2006;367:23–41.
Darvari R, Boroujerdi M. Concentration dependency of modulatory effect of amlodipine on P-glycoprotein efflux activity of doxorubicin—a comparison with tamoxifen. J Pharm Pharmacol 2004;56:985–91.
Desai PB, Nallani SC, Sane RS, Moore LB, Goodwin BJ, Buckley DJ, et al. Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregnane X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. Drug Metab Dispos 2002;30:608–12.
Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. J Pharmacol Exp Ther 2004;310:1062–75.
EFSA. Minimum criteria for the acceptance of in vivo alkaline comet assay reports. Efsa J 2012;10(11):2977–89.
Eguchi K, Nagase H, Ozawa M, Endoh YS, Goto K, Hirata K, et al. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. Chemosphere 2004;57:1733–8.
Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. J Hazard Mater 2005;117:1–11.
Frenzilli G, Nigro M, Lyons B. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutat Res Rev Mutat Res 2009;681:80–92.
Fucic A, Jazbec A, Mijic A, Seso-Simic D, Tomek R. Cytogenetic consequences after occupational exposure to antineoplastic drugs. Mutat Res 1998;416:59–66.
Gartiser S, Brinker L, Erbe T, Kümmerer K, Willmund R. Contamination of hospital wastewater with hazardous compounds as define § 7a. Acta Hydrochim Hydrobiol 1996;24:90–7.
Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. Chemosphere 1998;36:357–93.
Hartmann A, Alder AC, Koller T, Widmer RM. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. Environ Toxicol Chem 1998;17:377–82.
Hernando MD, Heath E, Petrovic M, Barceló D. Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC–MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. Anal Bioanal Chem 2006;385:985–91.
Hoffmann GR. A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. Dose–response 2009;7:1–51.
Huang Z, Roy P, Waxman DJ. Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. Biochem Pharmacol 2000;59:961–72.
Jean J, Perrodin Y, Pivot C, Trepo D, Perraud M, Droguet J, et al. Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. J Environ Manage 2012;103:113–21.
Johnson AC, Jürgens MD, Williams RJ, Kümmerer K, Kortenkamp A, Sumpter JP. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. J Hydrol 2008;348:167–75.
Jonker MJ, Piskiewicz AM, Castellà NII, Kammenga JE. Toxicity of binary mixtures of cadmium–copper and carbendazim–copper to the nematode *Caenorhabditis elegans*. Environ Toxicol Chem 2004;23:1529–37.
Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJM, Bongers M, Kammenga JE. Significance testing for synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ration-dependent effects in mixture dose–response analysis. Environ Toxicol Chem 2005;24(10):2701–13.
Jordan VC, Koerner S. Tamoxifen (ICI 46,474) and the human carcinoma 8S oestrogen receptor. Eur J Cancer 1975;11:205–6.
Kanuri M, Minko IG, Nechev LV, Harris TM, Harris CM, Lloyd RS. Error prone translesion synthesis past gamma-hydroxypropano deoxyguanosine, the primary acrolein-derived adduct in mammalian cells. J Biol Chem 2002;277:18257–65.
Karthikeyan KG, Meyer MT. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Sci Total Environ 2006;361:196–207.
Kerbusch T, de Kraker J, Keizer HJ, van Putten JW, Groen HJ, Jansen RL, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ifosfamide and its metabolites. Clin Pharmacokinet 2001;40:41–62.
Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. Environ Sci Technol 2002;36:1202–11.
Kuemmerer K, Steger-Hartmann T, Meyer M. Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. Water Res 1997;31:2705–10.
Lindberg R, Jarnheimer P-A, Olsen B, Johansson M, Tysklind M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. Chemosphere 2004;57:1479–88.
Lindberg RH, Wennberg P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BAV. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. Environ Sci Technol 2005;39:3421–9.
Liwei S, Jinmiao Z, Philip AS, Zijian W. Tamoxifen effects on the early life stages and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environ Toxicol Pharmacol 2007;24:23–9.
Lu SC, Huang HY. Comparison of sulfur amino acid utilization for GSH synthesis between HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. Biochem Pharmacol 1994;47:859–69.
Ma J, Lu N, Qin W, Xu R, Wang Y, Chen X. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. Ecotoxicol Environ Saf 2006;63:268–74.
Martins AF, Vasconcelos TG, Henriques DM, da S Frank C, König A, Kümmerer K. Concentration of ciprofloxacin in Brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: a case study. CLEAN — Soil Air Water 2008;36:264–9.
McLellan RA, Drobitch RK, Monshouwer M, Renton KW. Fluoroquinolone antibiotics inhibit cytochrome P450-mediated microsomal drug metabolism in rat and human. Drug Metab Dispos 1996;24:1134–8.
Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu X-J, Darroudi F, Kassie F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. Toxicology 2004;198:329–40.
Miao X-S, Bishay F, Chen M, Metcalfe CD. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. Environ Sci Technol 2004;38:3533–41.
Negreira N, López de Alda M, Barceló D. On-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of 17 cytostatics and metabolites in waste, surface and ground water samples. J Chromatogr A 2013a;1280:64–74.
Negreira N, Mastroianni N, López de Alda M, Barceló D. Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. Talanta 2013b;116:290–9.
Orias F, Perrodin Y. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: a review. Sci Total Environ 2013;454–455:250–76.
PhACT Database. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA); 2006.
Randall WA, Price CW, Welch H. Demonstration of hormesis (increase in fatality rate) by penicillin*. Am J Public Health Nations Health 1947;37:421–5.
Roberts PH, Thomas KV. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. Sci Total Environ 2006;356:143–53.
Rowney NC, Johnson AC, Williams RJ. Cytotoxic drugs in drinking water: a prediction and risk assessment exercise for the Thames catchment in the United kingdom. Environ Toxicol Chem 2009;28:2733–43.
Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Nallani SC, Desai PB. Role of human pregnane X receptor in tamoxifen- and 4-hydroxytamoxifen-mediated CYP3A4 induction in primary human hepatocytes and LS174T cells. Drug Metab Dispos 2008;36:946–54.
Santos LHLML, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Delarue-Matos C, Penas A, Barcelo D, et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. Sci Total Environ 2013;461–462:302–16.
Scripture CD, Sparreboom A, Figg WD. Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. Lancet Oncol 2005;6:780–9.
Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988;175:184–91.
Sridar C, Kent UM, Notley LM, Gillam EM, Hollenberg PF. Effect of tamoxifen on the enzymatic activity of human cytochrome CYP2B6. J Pharmacol Exp Ther 2002;301:945–52.
Thomas KV, Hilton MJ. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. Mar Pollut Bull 2004;49:436–44.
Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 2000;35:206–21.
Tjan-Heijnen VC, Postmus PE, Ardizzoni A, Manegold CH, Burghouts J, van Meerbeeck J, et al. Reduction of chemotherapy-induced febrile leucopenia by prophylactic use of ciprofloxacin and roxithromycin in small-cell lung cancer patients: an EORTC double-blind placebo-controlled phase III study. Ann Oncol 2001;12:1359–68.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr DR, Lee D-H, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr Rev 2012;33:378–455.

Verlicchi P, Al Aukidy M, Galletti A, Petrovic M, Barceló D. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. Sci Total Environ 2012;430:109–18.

Wenzel SDA, Schäfers C, Vollmer G, Michna H, Diel P, Köln DS, et al. Research efforts towards the development and validation of a test method for the identification of endocrine disrupting chemicals. Contract 2001;6:000015.

Xie H-J, Griskevicius L, Broberg U, Lundgren S, Carlens S, Meurling L, et al. Alteration of pharmacokinetics of cyclophosphamide and suppression of the cytochrome P450 genes by ciprofloxacin. Bone Marrow Transplant 2003;31:197–203.

Yusuf AT, Vian L, Sabatier R, Cano JP. In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using HeP G2 cells. Mutat Res 2000;468:227–34.

Zegura B, Heath E, Cernosa A, Filipic M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. Chemosphere 2009;75:1453–60.

Zorita S, Mårtensson L, Mathiasson L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. Sci Total Environ 2009;407:2760–70.

Zounkova R, Kovalova L, Blaha L, Dott W. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. Chemosphere 2010;81:253–60.

Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. J Hazard Mater 2005;122:205–9.

Article 2 :

Genotoxicity assessment in human cell lines exposed to ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water.

(Soumis)



Genotoxicity assessment in human cell lines exposed to ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water

Journal:	*Environmental and Molecular Mutagenesis*
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Mater, Nicolas; INP/ENSAT, UMR CNRS/INPT/UPS 5503, Department of Bioprocess & Microbial engineering Rodriguez-Mozaz, Sarah; Catalan Institute for Water Research, Castillo, Luis; Veolia, Barcelo, Damia; Chemical and Environmental Research Institute of Barcelona, Albsai, Claire; INP/ENSAT, UMR CNRS/INPT/UPS 5503, Department of Bioprocess & Microbial engineering Pfohl-Leszkowicz, Annie; University Toulouse, Bioprocess & microbila system
Key Words:	genotoxicity, DNA adduct, ciprofloxacin, tamoxifen, cyclophosphamide

Genotoxicity assessment in human cell lines exposed to ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water.

N. Mater[1], S. Rodriguez-Mozaz [2], L.Castillo[3], C. Albasi[1], Barcelò D[2], A. Pfohl-Leszkowicz[1*]

[1] Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSAT), 1 avenue Agrobiopôle, BP 32607, 31320 Auzeville-Tolosane, France.

[2] Catalan Institute for Water Research (ICRA), H2O Building, Scientific and Technological Park of the University of Girona, Emili Grahit 101, 17003 Girona, Spain.

[3] Veolia Environnement Recherche et Innovation, Centre de Recherche de Maisons Laffitte, 78603 Maisons Laffitte, France

*Corresponding author: Annie Pfohl-Leszkowicz, e-mail: leszkowicz@ensat.fr phone/fax: + 33 534 323 947

Abstract

DNA adduct detection using ^{32}P-postlabelling technique has been already used on aquatic organisms for biomonitoring genotoxicity of several pollutants, whereas investigations in human cell lines exposed to similar environmental contaminants and emerging pollutants such drugs are sparse. Ciprofloxacin (CIP), Tamoxifen (TAM) and Cyclophosphamide (CP) frequently used in anticancer treatments are partially released in hospital effluent and in the environment. Even though the concentrations are low (from ng/L to µg/L) no data exists concerning their ecotoxicological impact. The first objective of this study was to determine DNA adducts formation (early genotoxic effects).The second objective was to compare DNA adduct formation with DNA breaks (comet assay). Human hepatic cells (HepG2) and mammary cells (MCF-7) were exposed during 24h to increasing amount of drugs individually or in mixture. Tamoxifen induced a dose dependent DNA adduct formation on hepatic cells and a non-monotonic response on mammary cells. Neither CIP nor CP induced any bulky DNA adducts. A non-monotonic dose-response was observed when hepatic cells were exposed to both mixtures, while a dose dependent increase of DNA adducts was observed on mammary cells. The antagonist or synergistic effects observed when drugs are in mixture highlight the importance to investigate the ecotoxicological effects of chemical contaminations in water at low doses. High amount of DNA adducts and DNA breaks are formed in both cell lines exposed to hospital waste water and influent waste water. A significant decrease was observed with outflow water coming from the waste water treatment plant.

Key words: Ciprofloxacin; Tamoxifen; Cyclophosphamide; Genotoxicity; DNA adduct; Wastewater, Hormesis.

Introduction

In the last decade the constantly growing use of pharmaceutical and personal care products (PPCPs), in particular cytostatic agents, has become a new environmental problem. Actually, different sources like emissions from production sites or direct disposal of pharmaceuticals in households contribute to the potential pollution of the environment, but the main source of cytostatic compounds in wastewater and in the environment are excretions (urine and feces) of patients under medical treatment. Some of these treatments are chemotherapy or radiotherapy and require drugs mixture having toxic properties for cells. These drugs are classified in three categories by International Agency for Research on Cancer (IARC): carcinogenic for humans (class 1); likely carcinogenic (class 2A); potentially carcinogenic (class 2B). During the treatments, the drugs are eliminated in large proportion as parent compounds or metabolites in urine or feces. As sorting of the excretions of cancer patients is regarded as intractable and dangerous (WHO, 1999), antineoplastic drugs are continuously released into hospital wastewater and sewage network without pretreatment. They represent an indisputable release source of many bioactive substances used for medical and research purposes such as pharmaceuticals, radioisotopes or solvents (Emmanuel et al., 2005; Lenz et al., 2007; Verlicchi et al., 2012). Although many of these compounds are removed in wastewater treatment plants (WWTP), some molecules are directly released into the environment (Kümmerer et al., 1997; Halling-Sorensen et al., 1998; Besse et al., 2012) where they represent a potential toxic hazard for ecosystems and Human health via drinking water (Johnson et al., 2008). Concentrations of contaminants in drinking water are usually in the range from subnanogram/L to µg/L, which is generally below the detection limit of classical biological assays (Besse et al., 2012). Nevertheless many of them or their metabolites raise considerable toxicological concerns particularly when present as components of complex mixtures (Hernando et al., 2006; Zegura et al., 2009; Mater et al 2014). The risk posed by cytostatic molecules and by mixtures is still not well documented and it is not possible to conclude on their long-term effects on non-target organisms.

Until today, ecotoxicological effects have been assessed by biomonitoring using standardized tests or by no specific *in vitro* assays principally on aquatic life. Such tests however may not be suitable for anticancer drugs (Zounkova et al., 2010). Tools to characterize the efficacy of drug removal processes and to assess the impact of these pollutants on aquatic life and human health must be further developed and refined. Currently, the application of genotoxicity assay is an important approach for investigating the causal relationship between exposure to environmental pollutants and the human health effects (Pellacani et al.,

2006; Cavalcante et al., 2008; Pfohl-Leszkowicz, 2008). Genotoxicity biomarkers are now considered to be an integral part of this approach because exposure to genotoxic agents may exert damage beyond that of individuals and may be detected through several generations (Frenzilli et al., 2009; Phillips, 2005). The Comet assay has already been included in the strategy guidelines for the testing of chemicals mutagenicity (EFSA, 2012).

A previous risk assessment of low doses of antineoplastic compounds using a battery-based approach has been performed (Mater et al., 2014). In this later paper, three drugs were selected for their frequent use in cancer treatment. They are found at low doses in hospital wastewater, municipal wastewater treatment plant (WWTP) and surface water (Hartmann et al., 1998; Zuccato et al., 2005; Thomas & Hilton, 2004). Cyclophosphamide (CP) is primarily used as anticancer chemotherapeutic but is also used as an immunosuppressive agent in several treatments of arthritis, interstitial pneumonia, etc. or during organ transplantation. Tamoxifen (TAM) is a selective estrogen-receptor modulator used in breast cancer treatment, which acts as an antagonist competitor in the α-ER1 estrogen receptor (mammary tissues) and like an agonist competitor in cholesterol metabolism (Coezy et al., 1982; Jordan & Korner, 1972). Tamoxifen belongs to compounds put on the prioritization list, due to the potential of this substance to bioaccumulate in human body and probably in aquatic organisms (Jean et al., 2012). Ciprofloxacin (CIP), which belongs to the fluoroquinolone class, is an antibiotic that inhibits the enzyme activity necessary for replication, transcription, repair and recombination of bacterial DNA (McLellan et al., 1996). This drug is often used against the side effects of treatment protocols, particularly for fevers prevention and infections arising after chemotherapy of the breast cancer, cancer of ovaries or the small cell lung cancer (SCLC) (Tjan-Heijnen et al., 2001). The three drugs can be found in wastewater in range of 10 ng/L to 10 µg/L for TAM and CP, and 10 ng/L to 100 µg/L for CIP (Tomas & Hilton, 2004; Lindberg et al., 2004; Zorita et al., 2009; Zuccato et al., 2005; Roberts & Tomas, 2006). As CIP is widely used for therapeutic treatments, it is 10-fold more concentrated in hospital effluents and a 2-fold more concentrated in municipal WWTP effluents than TAM and CP. Among the fluoroquinolones, ciprofloxacin (CIP) was the most frequently detected in wastewater and surface waters with concentrations of several hundred ng/L (Kolpin et al., 2002; Miao et al., 2004; Karthikeyan and Meyer, 2006). Higher concentrations up to150 µg/L were even reported in the effluents from hospitals (Martins et al., 2008).

Although the comet assay was chosen in the first study (Mater *et al* 2014) for its sensitivity to detect small amounts of DNA damage, the good repeatability of the assay depends on several parameters and some experimental design is critical to the final statistical power of the conclusions. As part of controversies the use of the statistics to assess the results of studies often relate to the use of probability values to draw a

conclusion (Collins et al., 2008; Lovell, 2009). Furthermore, a limitation of the Comet assay is that aneugenic effects, which may be a possible mechanism for carcinogenicity and epigenetic mechanisms (indirect) of DNA damage such as effects on cell-cycle checkpoints are not detected (COM 2000). In contrast, bulky DNA adducts formations induced by carcinogens in early stage of exposure are generally considered as the first step inducing the apparition of mutation leading to development of cancer (Györffy et al., 2008; Pfohl-Leszkowicz, 1994a, b, 2008; Phillips, 2013). The term ‘‘bulky’’ DNA adducts was derived from the early experiments using 32P-postlabeling that were aimed at the detection of adducts of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Beach & Gupta, 1992). The term has been extended to include all relatively large aromatic and nonpolar carcinogen adducts. The ^{32}P-Postlabeling analysis is an ultrasensitive method for the detection and quantitation of DNA adducts and covalent modifications of the DNA (Rether *et al*, 1990; Pfohl-Leszkowicz *et al* 1991, 1993; Phillips *et al*., 1999). The assay requires only a few micrograms of DNA and allow the detection of DNA adduct as low as one adduct in 10^9–10^{10} normal nucleotides. It is applicable to a wide range of investigations in human, animal, and *in vitro* studies including monitoring exposure to environmental or occupational carcinogens, determining whether a chemical or a complex mixture has genotoxic properties, elucidation of the toxicological pathways of carcinogens, and monitoring DNA repair (Hemminki et al., 1997; Pfohl et al., 1993; 2008; Williams-Brown et al., 2011; Châtel et al. 2012, 2014; Cachot et al, 2013).

The aim of this paper was to analyze DNA adduct formation as potential sensitive biomarker for early-stage genotoxic evaluation of low doses of three drugs found in hospital effluents, river or drinking water. DNA adducts formation was evaluated on human hepatoma cell line (HepG2) and human mammary cell line (MCF-7) exposed to the drugs in range of environmental concentrations ranging from 1 ng/L to 100 µg/L. In parallel, the both cell lines have been exposed to raw effluents from hospital, and to the inflow and outflow of the municipal waste water treatment plant (WWTP). HepG2 cells have been chosen because they are extensively used for toxicity and genotoxicity evaluation of pure compounds and retained many of the properties of primary liver cells, including the metabolic activation (Lu and Huang, 1994; Amat *et al*, 2004; 2007). Owing their endogenous expression of a variety of xenobiotic metabolizing enzymes, this cell lines are useful for detecting the combined effects of chemical in mixture (Zegura et al., 2009; Mersch-Sundermann *et al*., 2004). MCF-7 cells have been chosen to detect the endocrine disruptor potential of compounds, including when they are present in mixtures (Levenson & Craig Jordan, 1997; Charles *et al*., 2002; Wong & Cheng 2012).

Materials and methods

Chemicals

Ciprofloxacin (CIP), tamoxifen citrate (TAM) and cyclophosphamide (CP) [**Figure 1]** were obtained from Sigma–Aldrich (France). Cell culture reagents including fetal calf serum, material and enzymes were obtained from Fisher scientific (France). The [^{32}P] Adenosine 5'-triphosphate, tetra-(triethylammonium) salt,10mM Tricine (pH 7.6) was obtained from PerkinElmer SAS (France). All solutions were prepared using ultrapure water.

Sample collection and pre-treatment

Wastewater samples were collected from effluent of "Dr. Josep Trueta" Hospital of Girona-Spain (around 400 beds), and from influent and effluent of the municipal WWTP of Girona. The town counts approximately 96.236 inhabitants. Hospital effluent and WWTP influent samples were taken during the morning (between 10 to 11 h am). The WWTP effluent samples were taken 27 h after (around 13 h pm). Amber glass bottles pre-rinsed with ultrapure water were used for sample collection. The samples were immediately vacuum-filtered through 1-μm glass fiber filters followed by 0.45 μm nylon membrane filters (from Whatman, Teknokroma, Barcelona, Spain). The samples were kept frozen at −20 °C in amber polyethylene terephthalate (PET) containers, for a period inferior of 1 month, based on the stability studies performed until their analysis (Ferrando-Climent et al., 2013).

Cell lines and culture

The HepG2 cell line (ATCC number: HB-8065) or MCF-7 cell line (ATCC number: HTB-22) was cultured in 75-cm^2 polystyrene flasks with Minimum Essential Medium and Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, respectively. All media were supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 10% L-glutamine 200 mM, 1% penicillin (100 U/mL), 1% streptomycin (100 mg/mL), 1 mM sodium pyruvate. Cells are maintained under an atmosphere of 5% CO_2 at 37°C and viable cell count was assessed by Trypan Blue exclusion before toxic evaluation.

Cell treatments

Ciprofloxacin (CIP), tamoxifen citrate (TAM) and cyclophosphamide (CP) are dissolved in HCl, methanol and water respectively for stock solution and stored at -20°C. Prior the treatments, the compounds are diluted in the culture medium in order to give a final solvent concentration below 0.01 %. None of these solvents at this

dose neither affected cell viability (data not shown) nor genotoxicity (data not shown).Hepatic cells (HepG2) and mammary cells (MCF-7) were exposed 24 h to increasing concentrations of respective drugs (CIP; TAM; CP), or to binary mixture of (CIP + TAM) or to mixture of the 3 drugs (CTC) in the range of concentrations found in water as described in table 1. Conditions 1 and 2 represent low concentrations close to environmental concentrations (surface water), condition 3 close to waste water treatment plant (WWTP), conditions 4 and 5 represent hospital wastewater concentrations. In condition 0 cells received only medium. This latter condition corresponds to control. In parallel, cells were treated 24 h with 1/10^{e} hospital effluent, WWTP influent and WWTP effluent. The control condition received only ultrapure water in same proportion.

Table 1: Nominal drug concentrations used for cell treatments.

Drugs (*individually*)	**Unit**						
CIP	µg/L	0	0.01	0.1	1	10	100
TAM	µg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10
CP	µg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10
Drugs *(in mixture)*	**Unit**	**Code Conditions**					
		0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
CIP	µg/L	0	0.01	0.1	1	10	100
TAM	µg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10
CIP	µg/L	0	0.01	0.1	1	10	100
TAM	µg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10
CP	µg/L	0	0.01	0.1	0.5	1	10

DNA adducts analysis

DNA isolation

The DNA was isolated as described by Pfohl & Castegnaro (2005). Briefly, cells were homogenized in 0.7 mL of a solution containing NaCl (0.1 M), EDTA (20 mM) and Tris-HCl, pH 8 (50 mM) (SET). To the homogenate, 100 µL of SDS (20%) were added and incubated for 10 min at 65°C. Then, 800 µL of potassium acetate (6 M, pH 5) were added and the reaction mixture was kept at 0°C for 30 min. After centrifugation for 25 min at 0°C (10 000g), the supernatant, which contained nucleic acids, was collected. The nucleic acids were precipitated overnight at −20 °C by adding two volumes of cold absolute ethanol. DNA pellets were collected and washed once with 1 mL of 90% ethanol and dissolved in 500 µL of SET (15 min at 37°C). The total extract was mixed with 10 µL of a mixture of RNase A (20 mg/mL) and RNase T1 (10

000 U/mL) and incubated for 1 h at 37°C; this treatment was repeated twice. Samples were then treated with 25 µL of proteinase K solution (20 mg/mL SET) for 1 h at 37 °C. After digestion, 500 µL of Rotiphenol were added and the mixture was moderately shaken for 20 min at room temperature. Samples were centrifuged for 15 min at 15°C (10 000g) and the aqueous phase was collected. Five hundred microliter of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) were added, the aqueous phase was collected and supplemented with 50 µL of sodium acetate (3 M, pH 6). The DNA was precipitated by the addition of two volumes of cold ethanol overnight at −20°C, and the precipitate was collected by centrifugation at 10 000g for 30 min. The DNA pellet was washed four times with 90% ethanol. The purity of the DNA was checked by recording UV spectra between 220 and 320 nm.

DNA ^{32}P-postlabelling

DNA (4 µg) was digested at 37°C for 4 h with 10 µL of the mix containing 1 µL of micrococcal nuclease (2 mg/mL corresponding to 500 mU), spleen phosphodiesterase (80 mU/sample or 20 mU/µg DNA), 1 µL of sodium succinate (200 mM) and 1 µL of calcium chloride (100 mM, pH 6). The digested DNA was then treated with 5 µL of the mix containing nuclease P1 (NP1) (4 mg/mL), $ZnCl_2$ (1 mM) and sodium acetate (0.5 M, pH 5) at 37°C for 45 min. The reaction was stopped by adding 3 µL of Tris base (500 mM). The DNA adducts were labeled as follows. To the NP1 digest, 5 µL of the reaction mixture containing 2 µL of bicine buffer (800 µM, pH 9.8), 9.6 U of polynucleotide kinase T4 and 100 µCi of [^{32}P]ATP (specific activity 5000 Ci/mmol) was added and incubated at 37°C for 45 min. Normal nucleotides, pyrophosphate and excess ATP were removed by chromatography on PEI/cellulose TLC plates in NaH_2PO_4 buffer (2.3 M, pH 5.7) overnight (D1). The origin areas containing labeled adducted nucleotides were cut out and transferred to another PEI/cellulose TLC plate, which was run in 4.8M lithium formate and 7.7 M urea (pH 3.5) for 2 h (D2). A further migration was performed after turning the plate 90° anticlockwise in 1 M NaH_2PO_4 and 4.5 M urea (pH 6.4) for 2 h (D3). Finally, the chromatogram was run in the same direction in 1.7 M NaH_2PO_4, pH 6, for 2 h (D4). Autoradiography was carried out at −80°C for 48 h in the presence of an intensifying screen. Radioactive spots were detected by autoradiography on Kodak super X-Ray film.

Quantification of DNA adducts

Quantitation of DNA adducts was obtained by storage phosphor imaging techniques employing intensifying screens at room temperature for 18 h. The screens were scanned using a Typhoon 9210 (Amersham). Software for processing the data was ImageQuant (version 5.0). After background subtraction, the amounts of DNA adducts were expressed amount of adduct per 10^9 nucleotides. To calculate the amount of screen response (screen pixel) in dpm, samples of [^{32}P] ATP at different concentrations from 10 to 500 dpm were

appropriately diluted and spotted on a TLC plate. The plate was then scanned with the samples to obtain a radioactivity scale.

Alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay

Treatment

Subcultures for experiments were prepared the day preceding the test. HepG2 cells were plated onto 12-multiwell plates at density of $1x10^5$ cells/well, allowing the attachment overnight. The medium was then discarded and replaced by 2 mL of test medium. Cells were incubated for 24h to 72h.

Slide preparation

The comet assay was performed according to Singh et al. (1988) with minor modifications. All the procedures were conducted in the dark and on ice to minimize spurious sources that might cause DNA damage. Conventional microscope slides were dipped in agarose 1.6% and allowed to dry on a flat surface at room temperature before experiment. A first layer of 0.8% normal melting point (NMP) in PBS (phosphate saline buffer containing NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 4.3 mM, KH_2PO_4 1.47 mM, pH 7.4) kept at 37°C was added onto frosted slides and gently covered with cover-slide. The cell pellet obtain by centrifugation 5min at 4°C, 4000 rpm, was suspended in 150 µL to a final cell-agarose solution containing approximately $5x10^4$ cells in 0.5% low melting point (LMP) agarose in PBS and 75 µL were added as second layer onto duplicate slides. A third layer of (75 µL 0.5% LMP agarose) were added and the slides were placed in fresh lysis solution (2.5M NaCl, 100 mM EDTA-Na_2, 10 mM Tris, pH 10 ; 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) at 4°C for 1 h. The slides were transferred on horizontal electrophoresis tray and submerged in denaturation buffer (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH 13) for 20 min. Electrophoresis was carried out using the same solution for 20 min at 26 V and 350 mA (0.8 V/cm) then the slides were gently washed three times for 5 min in a cold neutralizing buffer (400 mM Tris, pH 7.4). Slides were dried in methanol and stored in low humidity environment until analysis.

Slide analysis

Few minutes before analysis, 50 µL of ethidium bromide (40µg/mL) were dropped onto the agarose and covered with a coverslip. Fifty cells per slide were randomly scored at 250X magnification with an Olympus BX50 fluorescence microscope equipped with an excitation filter of 515–560 nm and a barrier filter 590 nm. DNA damage was quantified by tail DNA and median values were calculated by Komet 5.5 image analysis system (ANDOR Technology, Belfast, UK). Positive control was run using ethyl-methanesulfonate (EMS).

Statistical analysis

All samples were tested in duplicate and experiments were independently performed three times under the same conditions. Results were calculated in median values with standard deviation (SD). The measured values were compared with the standard condition using an analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's test. Statistical significance was accepted at $p<0.05$ (*) and $p<0.01$ (**). A second post-hoc test analysis for multiple comparisons was performed using *Dunnett's* procedure. Values were considered significant at p<0.05.

Results

DNA adducts formation in human cells exposed to three pure pharmaceuticals

DNA adduct formation in hepatic cells (HepG2)

Exposure of human hepatic cells (HepG2) to CIP and CP whatever the concentration did not induce any DNA adducts. In contrast, TAM induced DNA adducts. An example of DNA adducts patterns obtained after exposure of HePG2 cells is given figure 2. Depending of the exposure conditions, one to three individual adducts (numbered # 1-3) are formed when TAM was present alone or in the mixture. Exposure to TAM alone (Fig 2.B) induced formation of two individual adducts (# 1; 2). Whatever the concentration of exposure, TAM induced a significant (p<0.01) DNA adducts formation. A dose-dependent response was observed (figure 3). The exposure to concentration of TAM (10 µg/L) lead to three folds more DNA adducts (p<0.01) compared to exposure to the lowest dose (10 ng/L).

Only one individual adduct was formed when HePG2 cells were exposed to CIP in addition to TAM (Figure 2.C). The nature of this adduct was different of the two previous one, and for this reason has been numbered # 3. In this condition, a non-monotone dose response for the DNA adducts formation was observed. With the exposure to the lowest doses of CIP + TAM a synergy was observed, whereas for higher concentrations a dose dependent decrease of DNA adducts occurred. Low doses of CIP + TAM induced two folds more DNA adducts (p<0.01) compared to highest doses.

Simultaneous exposure to increasing concentrations of the three drugs (CIP + TAM + CP) lead to formation to only one adduct corresponding to the adduct # 1. The DNA adducts formation was dose dependent when the three drugs are present. In ternary exposure, CP has an antagonist effect on DNA adducts formation

compared to binary exposure. DNA adducts are three folds higher when cells are exposed to 10 ng/L TAM + 10 ng/L CIP ($p<0.01$) compared to 10 ng/L CP + 10 ng/L TAM + 10 ng/L CIP ($p<0.05$) (condition 1).

DNA adducts analysis on mammary cell MCF-7

Exposure of human mammary cells (MCF-7) to CIP and CP whatever the concentrations did not induce any DNA adducts. In contrast, TAM induces formation of one individual adduct numbered # 4. An example of DNA adducts patterns obtained after exposure of MCF-7 cells is given figure 5.

A non-monotone dose-effect relation (U-shape form) was observed when MCF-7 cells are exposed to TAM alone. Only the two intermediate concentrations induced significant DNA adducts ($p<0.01$). After exposure to 0.5 µg/L of TAM, two folds more DNA adducts ($p<0.01$) were formed compared to 1 µg/L exposure.

Whatever the drug mixture tested, a dose-dependent DNA-adducts formation was observed (Figure 7). CIP + TAM induced a significant dose-dependent increase of DNA adducts ($p<0.01$). DNA adducts are four folds ($p<0.01$) and 2.5 folds ($p<0.01$) higher when cells are exposed to condition 5 and 4, respectively, compared to control cells. CIP stimulated the formation of TAM-DNA adduct. Although the increase of DNA damage was also dose-dependent ($p<0.05$) when the three drugs are present simultaneously, the result showed clearly that ternary mixture induced a lowest genotoxicity compared to binary mixture. Comparison between binary and ternary exposure showed that CP has an antagonist effect.

DNA adducts formation on both human cell lines exposed to Hospital and waste water treatment plant (WWTP) effluents.

DNA adduct formation in hepatic cells (HepG2) exposed to water effluents

HepG2 cells were exposed during 24 h to hospital waste water, waste water treatment plant (WWTP) inflow and WWTP outflow to evaluate the genotoxic effects. Example of DNA adduct patterns in HepG2 is presented in figure 8. In HepG2 cells five to ten individual DNA-adducts (numbered # 1-10) depending of the conditions are formed. DNA-adducts having the same number are of the same nature.

Only small qualitative differences between exposure to Hospital effluents and WWTP inflow can be observed, except a significantly higher amount of adduct # 2 and the formation of adduct #6 after WWTP inflow exposure. In contrast, the DNA-adduct pattern was qualitatively different when the cells were exposed to WWTP outflow. For example, the DNA-adducts # 3; 4 disappeared, and new adducts were formed

(adducts # 7; 8; 9; 10). Quantitatively, exposure of hepatic cells HepG2 to hospital effluents induced a significant amount of DNA adducts reaching more than 200 adducts/ 10^9 nucleotides (figure 9). A higher genotoxic effect ($p<0.01$) was observed when HepG2 cells were exposed to the WWTP inflow sample (more than 300 adducts/ 10^9 nucleotides). Exposure to WWTP outflow induced a significant DNA adducts formation ($p<0.01$) compared to control but significantly less ($p<0.01$) compared to the two other samples (about 120 adduct/ adducts/ 10^9 nucleotides).

DNA adduct formation in mammary cells (MCF7) exposed to water effluents

In MCF-7 cells two to seven individual DNA-adducts (numbered # 1, 2; 6; 11; 12; 13; 14; 15) were formed (figure 10). The adduct #1 was the major one and was already formed in HepG2 cells. The adduct #6 already observed in HepG2 cells treated with WWTP outflow was also formed in MCF-7 cells. Adducts # 11 & 12 were exclusively formed in MCF7 exposed to hospital waste water; adduct #13 only when cells were exposed to WWTP inflow and adducts # 14 & 15 only when cells were exposed to WWTP outflow. The total DNA adduct amounts in MCF7, ranging from 190 to 75 adducts/ 10^9 nucleotides, were significantly lower compared to HePG2 cells. A significant decrease ($p<0.01$) of DNA damages were observed from hospital effluent to WWTP outflow.

DNA breaks formation on both human cell lines exposed to Hospital and waste water treatment plant (WWTP) effluents.

In the same way as for the analysis of DNA adduct formation, the presence of DNA breaks were evaluated in HepG2 cells and MCF-7 cells exposed to different water samples during 24 h. The results of HepG2 cells and MCF-7 cells are presented in Figure 12 and 13, respectively.

DNA breaks formation in hepatic cells (HepG2) exposed to water effluents

The exposure of hepatic cells HepG2 to hospital effluents induced significant DNA breaks ($p<0.01$) compared to the negative control (Figure 12). A slight increase of the genotoxic effect ($p<0.01$) was observed when HepG2 cells were exposed to the WWTP inflow sample, but the amount of DNA breaks did not exceed 10 %. Exposure to WWTP outflow induced a significant DNA breaks formation ($p<0.01$) compared to the control but significantly less ($p<0.01$) compared to the two other samples.

DNA adduct formation in mammary cells (MCF7) exposed to water effluents

Concerning the mammary cells MCF-7 exposed to different water samples, no significant DNA damages were detected after 24 h exposure. Although the amounts of DNA breaks detected were low, a similar trend than the DNA adducts analysis can be observed. Globally, a decrease of the genotoxicity was observed from the hospital effluents to the WWTP outflow effluents.

Discussion

After drug administration in the hospital, cytostatic drugs and human metabolites are directly discharged into communal sewage system without any specific control. Household discharge by out-patients represents another pathway of cytostatics in the environment (Bound and Voulvoulis, 2005). Due to their highly potent mechanism of action (cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and teratogenicity), cytostatic drugs could induce adverse effects on any growing eukaryotic organism and bacteria (Besse et al., 2012; Johnson et al., 2008). Since the accumulation of mutations in critical genes typically underpins these harmful capabilities, modern toxicology devotes much effort to identifying chemicals that cause mutations. Particular attention focusses on the mechanisms whereby bioactivation-dependent carcinogens form DNA-reactive metabolites that generate abnormal bases within the genome. Such 'DNA adducts' are central to chemical carcinogenesis since they can generate mutations during processing by DNA polymerases, trigger apoptosis or undergo enzymatic repair. DNA adducts are also useful biomarkers of carcinogen exposure in humans and animals (for a review see Pfohl-Leszkowicz, 2008).

This study focused on the genotoxicity reflected by DNA adducts formation of three drugs, belonging to different chemical classes (ciprofloxacin (CIP) a fluoroquinolone antibiotic; cyclophosphamide (CP) a neoplastic chlorinated compound; tamoxifen (TAM), an estrogenic compound used as anticancer agent).

A preliminary study investigating the risk assessment of these three drugs tested alone or in mixture was performed using a battery-based approach (Mater et al., 2014), including the comet assay detecting DNA breaks reflecting genotoxicity. None of the three drugs individually induced any DNA breaks, but in binary or ternary mixture a dose dependent formation of DNA breaks were observed (Mater et al 2004). To refine the genotoxic *in vitro* approach the ^{32}P postlabeling technique was chosen as tool to detect DNA damages which may or not be revealed by comet assay (COM, 2000).

Toxicology has long been dominated by an emphasis on very high doses and the assessment of toxic responses. In comparison with human health risk assessment, ecological risk assessment is poorly understood particularly with low doses exposures. The concentrations chosen were based on the range reported in the literature, although the concentrations of contaminants depend on the pharmaceutical usage patterns, the size of the surrounding population, the specific wastewater treatment available, and the

discharge location. The concentrations are not meant to be an exact match to what is found in one municipal wastewater treatment plant, or field site, but to represent concentrations that are environmentally reasonable. The high concentration tested was near the highest reported concentrations found in hospital wastewater up to 150 µg/L (Martins et al., 2008; Santos et al., 2013; Negreira et al., 2013).

In the range of doses tested (ng/L – 10 µg/L), CIP and CP did not induce any DNA damages independently of the cells lines. On the contrary, the exposure of hepatic cells HepG2 to TAM lead to a dose-dependent increase of total DNA adducts whereas the same treatment exhibited a U-shape curve with mammary cells MCF-7. More important the types of DNA adducts formed by TAM are not the same in the both cell lines. This can be explained by the biotransformation of TAM. TAM must be metabolized, notably by cytochromes P450 (CYP) into anti-estrogenic metabolites N-desmethyltamoxifen (*via* CYP3A), 4-hydroxytamoxifen and endoxifen (via CYP2D6) to exert its effects (Coezy et al., 1982; Desta et al., 2004). Some of these metabolites are then taken in charge by the hydroxysteroid sulfotransferase (Shibutani et al, 1998; Nishiyama et al 2002) and can cross react with DNA (Gamboa Da Costa et al, 2001; 2007) and formed two DNA adducts [(E-α-(deoxyguanosin-N2-yl)-tamoxifen and (E-α-(deoxyguanosin-N2-yl)-N-desmethyl-tamoxifen] (Figure 14). A third adduct (E-α-(deoxyguanosin-N2-yl)-4-hydroxytamoxifen) can be formed after additional biotransformation of 4-OH TAM via a two electron oxidation mechanism into quinone methid. Another adduct can also be formed after transformation of 4-OH TAM into catechol and finally into O-quinone (Dowers et al 2006) using the same pathways (aromatase and quinone reductase) as estrogens notably in mammary glands (Wong & Chen, 2012). TAM can also be biotransformed by flavin monooxygenase into TAM-N-oxide which will be taken in charge by hydroxysteroid sulfotransferase and give an additional DNA adduct (E-α-(deoxyguanosin-N2-yl)-N-oxid-TAM) (Shibutani *et al.* 2003) (figure 14). The qualitative difference of DNA adduct formation induced by TAM in HepG2 cells and MCF7 cells can be explain by the differential metabolic capacity of these cells lines. HepG2 cells of hepatic origin possess mainly CYP belonging to the family 1-4, whereas MCF7 express mainly aromatase, quinone reductase, peroxidases such cyclooxygenase and sulfatase. Interestingly, the dose-response curve of DNA adduct formation in MCF7 exposed to TAM present a U-shape, explained by the endocrine disruptor ability of TAM.

Indeed, TAM is an endocrine disruptor due to its agonist and antagonist effect on estrogen receptor (Coezy et al., 1982; Vandenberg et al., 2012) and androgenic receptors as evidenced by the YES/YAS test (Mater, 2014). The low doses stimulating hormetic responses could lead to enhancement of proliferation of tumors cells by antitumor drugs (Calabrese, 2005, 2013).

Absence of DNA adduct formation when cells were exposed to CP can be surprising, as CP also should be biotransformed to be cytotoxic. CP is activated *in vivo* to 4-hydroxycyclophosphamide (via CYP 2B6), which spontaneously breaks down into the reactive metabolites phosphoramide mustard and acrolein (Kerbish et al, 2001; Huang et al 2000). Phosphoramide mustard is an active bifunctional alkylating agent that has been shown to bind to the N 7 position of guanine, to the phosphate backbone of DNA and to interact with the O6 position of guanine, resulting in DNA cross links and cytotoxicity (Bohnenstengel et al, 1996). Being a bifunctional electrophile, acrolein also reacts with DNA bases to form several exocyclic DNA adducts, among which the γ-HOPdG (8-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydropyrimido[1,2-a]-purin-10(3H)-one(1,N2-γ-hydroxypropano deoxyguanosine) (Chung et al 1984 ; Pawlowicz et al. 2006).

The reason why no DNA adducts has been shown is due to the fact that the technique of DNA adduct used in this study (enrichment by nuclease P1) did not allow the analysis of alkylation or ethenobase. Separation of DNA adducts by HPLC permit to detect acrolein-adduct (data not shown). Repair of alkylation or cross link induced abasic site and DNA breaks. Nevertheless, in our conditions of incubation, we did not observe any DNA breaks when the cells were exposed to CP alone (Mater et al, 2014). This is in line of the studies of Uhl et al (2000) and Yusuf et al (2000) on hepatic cells, and of Perry et al (1995) and Ohno et al (2008) on MCF7, who observed DNA breaks only after exposure to CP over 1mg/L. Thus the absence of DNA breaks and DNA adduct can also be due to the low doses of CP (max 10µg/L).

Considering that these drugs can co-occur in water, the toxic effects of mixtures (CIP + TAM and CTC) were compared to their individual effects. Both binary and ternary exposures of cells revealed globally a dose-dependent increase of the total DNA adducts amount, more pronounced on MCF-7 cells than in HepG2. In addition, the DNA adduct pattern in hepatic cells was modified when TAM was in presence of CIP or CIP +CP. When HepG2 cells were exposed to TAM and CIP, CIP inhibited the formation of the specific TAM adducts (#1 & 2) and induced the formation of another adduct (#3). This can be explained by the interaction of CIP on biotransforming enzymes involved in the metabolic pathway of TAM. Indeed CIP is an inhibitor of CYP 3A activity *in vitro* and *in vivo* (Xie et al*.,* 2003). The inhibition of CYP 3A favors the formation of 4-OH-TAM, exhibiting the estrogenic activity, and which can undergo further transformation into quinone methide, resulting in formation of (E) α (deoxyguanosin-N2-yl)-4 OH TAM (Figure 15). When the cells were exposed to the three drugs the interaction is more complex. The DNA-adducts (# 2 and #3) were not formed anymore whereas adduct (#1) was increased. While CIP inhibits CYP 3A4 (Xie et al, 2003) and β glucuronidase (Kodawara *et al*. 2014), TAM and its metabolites (N-desmethyl-TAM, 4-OH-TAM) induce CYP 3A4 (Desai *et al*. 2002; Sane *et al*. 2008) but inhibit CYP 2B6, 2C9 and 2D6 (Sridar *et al.* 2002). It has been shown in

human that low dose of TAM modified the metabolic profil (Kisanga et al 2005). Induction or inhibition of CYP activity mediated by concomitantly administered drugs can change the balance between the activating and inactivating metabolic pathways of CP (Scripture et al., 2005). Inhibition of CYP 3A4 by CIP will increase preferentially in one hand the formation of 4-OH-TAM and in another hand the formation of acrolein and 4-OH cyclophosphamide. The immunosuppressive effect of CP is hampered by CIP explaining that treatment did not anymore combine these two drugs (CIP + CP) as described by Afsharian et al. (2005). These two latter metabolites are known to be responsible of DNA breaks. This can explain the formation of DNA breaks in cells (Mater et al, 2014) when the cells were exposed to binary or ternary mixture, whereas no breaks was found when the drugs were applied alone. In the same time, inhibition of CYP 2B6 and induction of CYP 3A4 by TAM lead to the formation of chloroacetaldehyde, the dechlorinated metabolites of CYP, which is highly cytotoxic. Interference between the different drugs can be also due to the conjugating pathway. Indeed, one main metabolite of CIP is sulfociprofloxacine (Borner et al, 1986, Anadon et al 2001, Drusano 1987). Thus a competition for sulfonation can occur between CIP and TAM, reducing the formation TAM-DNA adducts and N-oxid-TAM adducts (Gamboa Da Costa et al. 2001; 2007). In the case of MCF7 pathway responsible of DNA adduct formation induced by TAM was different of that of HepG2. Only one DNA adduct was formed, and was not of the same nature as the three DNA-adducts observed in hepatic cells. Moreover, when the cells were exposed to binary or ternary mixture, the nature of the DNA adduct was similar in all conditions. Only the intensity of the DNA-adduct changed, and was the highest when TAM and CIP were applied together. The increase was dose-dependent, whereas a hormetic dose response was observed when MCF7 cells were exposed to TAM alone. Hormesis is connected with both acclimation and phenotypic plasticity, and may play an important role in allowing animals to adjust to changing environments (Costantini et al., 2010). Deviations from linearity are favored by the occurrence of multiple concurrent and sequential events in toxicological responses. Mechanisms contributing to hormetic responses at low doses included overcompensation to a disruption in homeostasis; adaptive responses based on inducible repair processes; interactions among cell proliferation, cell-cycle delay, apoptosis, and DNA damage; enhancement of gap junction intercellular communication at low doses but inhibition at high doses; etc. (for a review see Hoffman, 2009). Hormesis is a biphasic dose response that often results from the actions of partial agonists and partial antagonists. For example CIP which inhibited bacterial topoisomerase/gyrases type II, decrease cell viability (Herold et al 2002) which has been correlated to apoptotic Bax gene (Aranha et al 2000). In the same way TAM inhibited telomerase leading to apoptosis in HePG2 cells (Brandt et al 2004, 2005). At least, acrolein interfered with NFkB and transcriptor factor AP1, inducing apoptosis (Keher & Biswal, 2000).

In the second part of this study we analyzed the genotoxicity of sewage and purified water, using both comet assay (DNA breaks formation) and post-labelling (DNA adducts formation). Cyclophosphamide, tamoxifen and ciprofloxacin were detected in these hospital effluents and in the urban influents of the sewage treatment plant although most of them were totally eliminated after WWTP. Only cyclophosphamide, tamoxifen and ciprofloxacin were found in both WWTP effluent and in the receiving river at a concentration range between nd-20 ng/ L, 25-38 ng/ L and 7-103 ng/ L respectively (Ferrando-Climent *et al.* 2014) .In both cells, DNA adducts were detected, whereas DNA breaks are only observed in HePG2. Qualitatively ten individual DNA adducts were formed in HePG2 whereas only five were formed in MCF7. Some DNA adducts are formed in both cell lines (adducts (#1, 2, 6), but some others were specific from the cells. Whatever the cell lines, a significant decrease of DNA adducts and DNA breaks were observed between inflow sewage and outflow water. Increasing formation of DNA adducts and DNA breaks in inflow sewage compared to hospital effluent in HePG2 cells, can be explained by the fact that other contaminants than that released by hospital induced the genotoxicity. On the contrary a constant decrease of DNA adduct and DNA breaks from hospital to outflow water in MCF7 cells indicated that the agents responsible of the genotoxic effect in this cell line are related to endocrine disruptors used in hospital. Again, the metabolic capacity of cell lines plays a crucial role in the genotoxicity. Altogether, these data pinpoints the interest to applied several tests to be able to qualify a water, and also follow the water-treatment plant efficacy. More works are needed to put in parallel the contaminants released in the sewage and the ecotoxic effects observed.

In conclusion, our results show that cell lines are an excellent tool for genotoxicity assessment of pharmaceuticals. Both the Comet and post labelling assays are equally well suited for the ecotoxic assessment. The advantages of *in vitro* assay are their simple handing, high reproducibility and the possibility to screen a large number of compounds in a short time.

In the future, genotoxicity assays (notably DNA adduct detection) in cell lines can be a valuable tool in the risk assessment to estimate and rank the genotoxicity of compound in order to minimize toxicity test *in vivo*. They may be involved in a tired approach to assess the ecotoxicity of pharmaceuticals.

Statement of Author Contributions

Pfohl-Leszkowicz A, Albasi C., Castillo L. designed the study in the context of the PhD of Mater N. Rodriguez-Mozaz S. and Barcelò D.designed the field study and collected water samples. Mater N.and Pfohl-Leszkowicz A. analyzed the data and prepared draft figures and tables. All authors approved the final manuscript and had complete access to the study data.

Acknowledgments

This paper was prepared with financial support by the French national research agency, in the frame work of the call 2010 "CD2I" within the project "PANACEE", and with the collaboration of ICRA Institute (Girona, Spain) within the trans-Pyrenean MbRMed Project. The authors declare that there are no conflicts of interests.

References

Afsharian P, Möllgard ZH, Xie H, Kimby E, Hassan M. 2005. The effect of ciprofloxacin on cyclophosphamide pharmakocinetics in patients with non-Hodgkin lymphoma. European Journal of Haematology, 75(3): 206-211.

Altenburger R, Nendza M, Schürmann G. 2003. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. Environ Toxic Chem 22:1900–1915.

Amat A, Castegnaro M, Pfohl-Leszkowicz A. 2004. Genotoxic activity of thiophenes on human cell line (HEPG2). Polycyclic aromatic hydrocarbon 24: 733-742

Amat A, Castegnaro M, Pfohl-Leszkowicz A. 2007. Genotoxic activity and induction of biotransformation enzymes in two human cell lines after treatment by Erika fuel extract. Environ Toxicol Pharmacol 23: 89-95.

Anadon A, Martinez-Larragna MR, Iturbe J, Martinez MA, Diaz MJ, Frejo MT, Martinez M. 2001. Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. Research in Veterinary Science, 71(2), 101-109Aranha, O., Wood, D.P., Sarkar, F.H., 2000. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. Clinical Cancer Research 6: 891–900

Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG. 1991. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1: 611–614.

Baumgartner A, Cemeli E, Anderson D. 2007. The comet assay in male reproductive toxicology. Cell Biol Toxicol 25: 81–98.

Beach AC, Gupta RC. 1992. Human biomonitoring and the 32P-postlabeling assay. Carcinogenesis 13:1053-1074.

Besse J-P, Latour J-F, Garric J. 2012. Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? Environ Int 39: 73–86.

Borner K, Höffken G, Lode H, Koeppe P, Prinzing C, Glatzelc P, Wiley R, Olschewski P, Sievers B, Reinitz. 1986. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in healthy volunteers after oral and intravenous administration. European JClin Microbiol 5(2): 179-186

Bound JP, Voulvoulis N. 2006. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. Water Research 40: 2885–2892.

Bouraoui S, Brahem A, Tabka F, Mrizek N, Saad A, Elghezal H. 2011. Assessment of chromosomal aberrations, micronuclei and proliferation rate index in peripheral lymphocytes from Tunisian nurses handling cytotoxic drugs. Environ Toxicol Pharmacol 31: 250–257.

Brandt S, Heller H, Schuster KD, Grot J. 2004. Tamoxifen induces suppression of cell viability and apoptosis in the human hepatoblastoma cell line HepG2 via down-regulation of telomerase activity. Liver international 24: 46-54.

Brandt S, Heller H, Schuster KD, Grot J. 2005. The tamoxifen-induced suppression of telomerase activity in the human hepatoblastoma cell line HepG2: a result of post-translational regulation. J Cancer Res Clin Oncol 131: 120-128

Breithofer A, Graumann K, Scicchitano MS, Karathanasis SK, Butt TR, Jungbauer A. 1998. Regulation of human estrogen receptor by phytoestrogens in yeast and human cells. J Steroid Biochem Mol Biol 67: 421–429.

Buerge IJ, Buser, H-R, Poiger T, Müller MD. 2006. Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. Environ Sci Technol 40: 7242–7250.

Burgaz S, Karahalil B, Bayrak P, Taşkin L, Yavuzaslan F, Bökesoy I, Anzion RB, Bos RP, Platin, N. 1999. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. Mutat. Res. 439: 97–104.

Burgaz S, Karahalil B, Canhi Z, Terzioglu F, Ançel G, Anzion RBM, Bos RP, Hüttner E. 2002. Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to antineoplastics by the analysis of chromosomal aberrations. Hum Exp Toxicol 21: 129–135.

Cachot J, Cherel Y, Larcher T, Pfohl-Leszkowicz A, Laroche J, Quiniou L, Morin J, Schmitz J, Burgot T, Pottier D. 2013. Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European Flounder (Platichthys flesus) collected in the Seine estuary versus two estuarine system on the French Atlantic coast. Environ Sci Pollution Res 20: 723-737

Calabrese EJ. 2005. Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. Crit. Rev. Toxicol. 35: 463-582.

Calabrese EJ. 2013. Hormesis once marginalized, Evidence Now Supports Hormesis as the Most Fundamental Dose Response. M.P. Mattson, E.J. Calabrese, Hormesis, DOI 10.1007/978-1-60761-495-1_2 Springer science + Buissness media.

Cavalcante DGSM, Martinez CBR, Sofia SH. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish Prochilodus lineatus. Mut Res/Genetic ToxicolEnviron Mutagenesis 655: 41–46.

Carabineiro SAC, Thavorn-Amornsri T, Pereira MFR, Figueiredo JL. 2011. Adsorption of ciprofloxacin on surface-modified carbon materials. Water Res. 45: 4583–4591.

Catastini C, Mullot J-U, Boukari ., Mazellier P, Levi Y, Cervantes P, Ormsby J-N. 2010. Identification de molécules anticancéreuses dans les effluents hospitaliers. European Jwater quality 39 : 171–180.

Châtel A, Faucet-Marquis V, Perret M, Gourlay-Francé C, Uhrer, Pfohl-Leszkowicz A, Vincent-Hubert F. 2012. Genotoxicity assessement and detoxification induction in Dreissena polymorpha exposed to benzo[a]pyrene. Mutagenesis 27(6) : 703-711

Châtel A, Faucet-Marquis V, Gourlay-Francé C, Pfohl-leszkowicz A, Vincent-Hubert F. 2014. Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels Dreissena polymorpha along the Seine River. Ecotoxicology and environmental safety, (in press) http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.023

Chung FL, Young R, Hecht SS. 1984. Formation of Cyclic 1,N2-Propanodeoxyguanosine Adducts in DNA upon Reaction with Acrolein or Crotonaldehyde. Cancer Res 44:990-995

Chou T-C. 2006. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. Pharmacological Reviews 58: 621–681.

Chou T-C. 2011. The mass-action law based algorithm for cost-effective approach for cancer drug discovery and development. American J Cancer res 1: 925-935.

Coe TS, Hamilton PB, Hodgson D, Paull GC, Stevens JR, Sumner K, Tyler CR. 2008. An environmental estrogen alters reproductive hierarchies, disrupting sexual selection in group-spawning fish. Environ. Sci. Technol. 42 : 5020–5025.

Coezy E, Borgna J-L, Rochefort H. 1982. Tamoxifen and Metabolites in MCF7 Cells: Correlation between Binding to Estrogen Receptor and Inhibition of Cell Growth. Cancer Res 42: 317–323.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R, 2008. The comet assay: topical issues. Mutagenesis 23: 143–151

COM (Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment), COM guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity, United Kingdom, December 2000.

Costantini D, Metcalfe NB, Monaghan P. 2010. Ecological processes in a hormetic framework. Ecology Letters 13: 1435–1447.

Crane M, Watts C, Boucard T. 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. Sci. Total Environ. 367: 23–41.

Darvari R, Boroujerdi M. 2004. Concentration dependency of modulatory effect of amlodipine on P-glycoprotein efflux activity of doxorubicin—A comparison with tamoxifen. J. Pharm. Pharmacol. 56: 985–991.

Desai PB, Nallani SC, Sane RS, Moore LB, Goodwin BJ, Buckley DJ, Buckley AR. 2002. Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregnane X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. Drug Metab. Dispos. 30: 608–612.

Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. 2004. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. J. Pharmacol. Exp. Ther. 310: 1062–1075.

Dowers TS, Qin ZH, Tatcher GRJ, Bolton JL. 2006. Bioactivation of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). Chem ResToxicol 19(9): 1125-1137

Drusano GL, Weir M, Forrect A, Plaisance K, Emm T, Standiford HC. 1987. Pharmacokinetics of intravenously administered ciprofloxacin in patients with various degrees of renal function. Antimicrobial Agents Chem 31(6): 860-864

EFSA 2012. Minimum Criteria for the acceptance of in vivo alkaline Comet Assay. Reports Efsa J, 10 (11): 2977-2989.

Eguchi K, Nagase H, Ozawa M, Endoh YS, Goto K, Hirata K, Miyamoto K, Yoshimura H. 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. Chemosphere 57: 1733–1738.

Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P. 2005. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. J Hazardous Materials 117: 1–11.

Ferrando-Climent L, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo D.2014. Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment. Environmental Pollution 193 : 216-223

Frenzilli G, Nigro M, Lyons B. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mut Res/Reviews Mut Res 681: 80–92.

Fucic A, Jazbec A, Mijic A, Seso-Simic D, Tomek R. 1998. Cytogenetic consequences after occupational exposure to antineoplastic drugs. Mutat. Res. 416: 59–66.

Gamboa da Costa G, McDaniel-Hamilton P, Heflich RH, Marques MM, Beland FA. 2001. DNA adduct formation and mutant induction in Sprague–Dawley rats treated with tamoxifen and its derivatives. Carcinogenesis 22(8): 1307-1315

Gamboa da Costa G, Marques Fu X, Churchwell MI, Wang YP, Doerge R, Beland FA. 2007. Effect of *N,N*-didesmethyltamoxifen upon DNA adduct formation by tamoxifen and α-hydroxytamoxifen. Cancer Letters 257(2): 191-198.

Gartiser S, Brinker L, Erbe T, Kümmerer K, Willmund R. 1996. Contamination of hospital wastewater with hazardous compounds as define § 7a. Acta hydrochimt Hydrobiol 24: 90–97.

Gyorffy E, Anna L, Kovacs K, Rudnai P, Schoket B. 2007. Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts. Mutagenesis 23: 1–18.

Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE, 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review. Chemosphere 36: 357–393.

Hartmann A, Alder AC, Koller T, Widmer R.M. 1998. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. Environ Toxicol Chem 17: 377–382.

Hemminki K, Rajaniemi H, Koskinen M, Hansson J. 1997. Tamoxifen-induced DNA adducts in leucocytes of breast cancer patients. Carcinogenesis 18: 9–13.

Hernando MD, Heath E, Petrovic M, Barceló D. 2006. Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. Anal Bioanal Chem 385: 985–991.

Hoffmann GR. 2009. A Perspective on the Scientific, Philosophical, and Policy Dimensions of Hormesis. Dose-Response 7: 1–51.

Huang Z, Roy P, Waxman DJ. 2000. Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. Biochem pharmacol 59 : 961–972.

Jean J, Perrodin Y, Pivot C, Trepo D, Perraud M, Droguet J, Tissot-Guerraz F, Locher F. 2012. Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. J. Environ. Manage. 103: 113–121.

Johnson AC, Jürgens MD, Williams RJ, Kümmerer K, Kortenkamp A, Sumpter JP. 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. JHydrology 348: 167–175.

Jonker MJ, Piskiewicz AM, Castellà NII, Kammenga JE. 2004. Toxicity of binary mixtures of cadmium-copper and carbendazim-copper to the nematode Caenorhabditis elegans. Environ Toxicol Chem 23: 1529–1537.

Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJM, Bongers M, Kammenga JE. 2005. Significance testing for synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ration-dependent effects in mixture dose-response analysis. Environ Toxicol Chem 24(10):2701-2713.

Jordan VC, Koerner S. 1975. Tamoxifen (ICI 46,474) and the human carcinoma 8S oestrogen receptor. Eur J Cancer 11: 205–206.

Kanuri M, Minko IG, Nechev LV, Harris TM, Harris CM, Lloyd RS. 2002. Error prone translesion synthesis past gamma-hydroxypropano deoxyguanosine, the primary acrolein-derived adduct in mammalian cells. J. Biol. Chem. 277: 18257–18265.

Karthikeyan KG, Meyer MT. 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Sci. Total Environ. 361: 196–207.

Keher JP, Biswal SS. 2000. The molecular effects of acrolein. Toxicological Sci 57(1): 6-15.

Kerbusch T, de Kraker J, Keizer HJ, van Putten JW, Groen HJ, Jansen RL, Schellens JH, Beijnen JH., 2001. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ifosfamide and its metabolites. Clin Pharmacokinet 40: 41–62.

Kisanga ER, Mellgren G, Lien EA. 2005. Excretion of Hydroxylated Metabolites of Tamoxifen in Human Bile and Urine. Anticancer Res 25(6): 4487-4492

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Environ. Sci. Technol. 36: 1202–1211.

Kuemmerer K, Steger-Hartmann T, Meyer M. 1997. Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. Water Research 31: 2705–2710.

Lenz K, Mahnik SN, Weissenbacher N, Mader RM, Krenn P, Hann S, Koellensperger G, Uhl M, Knasmüller S, Ferk F, Bursch W, Fuerhacker M. 2007. Monitoring, removal and risk assessment of cytostatic drugs in hospital wastewater. Water Science & Technology 56: 141.

Lindberg R, Jarnheimer P-A, Olsen B, Johansson M, Tysklind M. 2004. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. Chemosphere 57: 1479–1488.

Lindberg RH, Wennberg P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BAV. 2005. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. Environ. Sci. Technol. 39 : 3421–3429.

Liwei S, Jinmiao Z, Philip AS, Zijian W. 2007. Tamoxifen effects on the early life stages and reproduction of Japanese medaka (Oryzias latipes). Environ Toxicol Pharmacol 24: 23-29.

Lovell DP. 2009. Statistical Analysis of Comet Assay date. The comet assay in toxicology, Toxicology 5: 422-450.

Lu SC, Huang HY. 1994. Comparison of sulfur amino acid utilization for GSH synthesis between HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol. 47 : 859–869.

Ma J, Lu N, Qin W, Xu R ,Wang Y, Chen X. 2006. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. Ecotoxicol. Environ. Safety 63: 268–274.

Martins AF, Vasconcelos TG, Henriques DM, Frank CS, König A, Kümmerer K. 2008. Concentration of Ciprofloxacin in Brazilian Hospital Effluent and Preliminary Risk Assessment: A Case Study. CLEAN – Soil, Air, Water 36 : 264–269.

Mater N. 2014 Evaluation de l'impact (éco) toxicologique de résidus médicamenteux présents dans les effluents hospitaliers, urbains et dans l'environnement à l'aide d'une batterie de bioessais et de biomarqueurs. PhD thesis form Toulouse University, INPT, 20th June 2014 (in french)

Mater N, Geret F, Castillo L, Faucet-Marquis V, Albasi C, Pfohl-Leszkowicz A. 2014. In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water. Environment International 63: 191–200.

McLellan RA, Drobitch RK, Monshouwer M, Renton KW. 1996. Fluoroquinolone antibiotics inhibit cytochrome P450-mediated microsomal drug metabolism in rat and human. Drug Metab. Dispos. 24: 1134–1138.

Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu X-J, Darroudi F, Kassie F. 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. Toxicology 198: 329–340.

Miao X-S, Bishay F, Chen M, Metcalfe CD. 2004. Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada. Environmental Sci Techno 38 : 3533–3541.

Negreira N, López de Alda M, Barceló D. 2013. On-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 17 cytostatics and metabolites in waste, surface and ground water samples. J Chromatogr A 1280 : 64–74.

Negreira N, Mastroianni N, López de Alda M, Barceló D. 2013. Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. Talanta 116: 290–299.

Nishiyama T, Ogura K, Nakano H, Ohnuma T, Kaku T, Hiratsuka A, Muro K, Watabe T., 2002. Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifens by human liver UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. Biochem Pharmacol 63(10): 1817-1830

Ohno K, Ishihata K, Tanaka-Azuma Y, Yamada T. 2008. A genotoxicity test system based on p53R2 gene expression in human cells: Assessment of its reactivity to various classes of genotoxic chemicals. Mut Res/Genetic Toxicol Environ Mutagenesis 656: 27-35

Orias F, Perrodin Y. 2013. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. Sci Total Environ. 454–455: 250–276.

Pawlowicz A, Munter T, Zhao Y, Kronberg L. 2006. Formation of Acrolein Adducts with 2'-Deoxyadenosine in Calf Thymus DNA. Chem. Res. Toxicol. 19 (4): 571–576

Pellacani C, Buschini A, Furlini M, Poli P, Rossi C. 2006. A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. Aquatic Toxicol 77: 1–10.

Perry R, Kang Y, Greaves B. 1995. Effects of tamoxifen on growth and apoptosis estrogen-dependent and –independent human breast cancer cells. Annals of Surgical Oncology 2: 238-245

Pfohl-Leszkowicz A. 1994a. Detection of DNA adducts as biomarkers for exposure to environmental carcinogens Analusis 22: M12-M15

Pfohl-Leszkowicz A. 1994b. Effet des cancérogènes sur la méthylation biologique de l'ADN et détection des adduits à l'ADN. Regard sur la Biochimie 3 : 51-61

Pfohl-Leszkowicz A. 2008. Formation, persistence & significance of DNA adduct formation in relation to some pollutants from a board perspective. Advance Toxicol 2: 183-240.

Pfohl-Leszkowicz A, Castegnaro M. 2005. Further arguments in favour of direct covalent binding of Ochratoxin A (OTA) after metabolic biotransformation. Food AddContam Suppl 1: 75-87.

Pfohl-Leszkowicz A, Chakor K, Creppy EE, Dirheimer G. 1991; DNA-adducts formation after treatment of mice with ochratoxine A. IARC Scientific Public. 115 *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tracts Tumours*, 245-253

Pfohl-Leszkowicz A, Weber-Lofti F, Masfaraud JF, Devaux A, Laouedj A, Guillemaut P, Malaveille, C, Rether B, Monod G., Dirheimer G. 1993. DNA adduct detection: some applications to monitor exposure to environmental genotoxic chemicals., IARC Scientific Public., 124("Postlabelling methods for detection of DNA adducts"), 373-378

PhACT Database, 2006. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA).

Phillips DH. 2005. DNA adducts as markers of exposure and risk. Mut Res/Fundam Mol Mecha Mutagenesis 577: 284–292.

Phillips DH, Arlt VM. 2007. The 32P-postlabeling assay for DNA adducts. Nature Protocols 2: 2772 – 2781.

Phillips DH. 2013. On the origins and development of the 32P-postlabelling assay for carcinogen–DNA adducts. Cancer Letters 334: 5–9.

Randall WA, Price CW, Welch H. 1947. Demonstration of Hormesis (Increase in Fatality Rate) by Penicillin. American J Public Health and the Nation Health 37: 421–425.

Rether B, Pfohl-Leszkowicz A, Guillemaut P, Keith G. 1990). Benzo(a)pyrene induces nuclear DNA adducts in plant cell suspension culture. Detection by 32P postlabelling. FEBS Lett 236: 172-174

Roberts PH, Thomas KV. 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. Sci Total Environ 356: 143–153.

Rowney NC, Johnson AC, Williams R.J. 2009. Cytotoxic drugs in drinking water: a prediction and risk assessment exercise for the thames catchment in the United kingdom. Environ Toxicol Chem 28: 2733–2743.

Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Nallani SC, Desai PB. 2008. Role of Human Pregnane X Receptor in Tamoxifen- and 4-Hydroxytamoxifen-Mediated CYP3A4 Induction in Primary Human Hepatocytes and LS174T Cells. Drug Metab Disp 36: 946–954.

Santos LHLML, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Delarue-Matos C, Penas A, Barcelo D, Montenegro MCBSM, 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. Sci Total Environ 461–462: 302–316.

Scripture CD, Sparreboom A, Figg WD. 2005. Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. Lancet Oncol. 6: 780–789.

Shibutani S, Shaw PM, Suzuki N, Dasaraghi L, Duffel MW, Terashima I. 1998. Sulfation of alpha-hydroxytamoxifen catalyzed by human hydroxysteroid sulfotransferase results in tamoxifen-DNA adducts. Carcinogenesis 19(11): 2007-2011

Shibutani S, Suzuki N, Laxmi YRS, Schild LJ, Divi RL, Grollman AP, Poirier MC. 2003, Identification of Tamoxifen-DNA Adducts in Monkeys Treated with Tamoxifen. Cancer Res 63: 4402–4406.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Res 175: 184–191.

Sridar C, Kent UM, Notley LM, Gillam EM, Hollenberg PF. 2002. Effect of tamoxifen on the enzymatic activity of human cytochrome CYP2B6. JPharmacol Experim Therapeutics 301: 945–952.

Thomas KV, Hilton MJ. 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. Mar Pollut Bull 49: 436–444.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mo Mutagen 35: 206–221.

Tjan-Heijnen VC, Postmus PE, Ardizzoni A, Manegold CH, Burghouts J, van Meerbeeck J, Gans S, Mollers M, Buchholz E, Biesma B, Legrand C, Debruyne C, Giaccone G. 2001. Reduction of chemotherapy-induced febrile leucopenia by prophylactic use of ciprofloxacin and roxithromycin in small-cell lung cancer patients: an EORTC double-blind placebo-controlled phase III study. Ann Oncol 12: 1359–1368.

Uhl M, Helma C ,Knasmüller S. 2000.Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. Mutation Res 468: 213-225

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers J.P. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr Rev 33: 378–455.

Verlicchi P, Al Aukidy M, Galletti A, Petrovic M, Barceló D. 2012. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. Sci Total Environ 430: 109–118.

Wong C, Chen S. 2012. The development, application and limitations of breast cancer cell lines to study tamoxifene and aromatase inhibitor resistance. J Steroid Biochem Molecular Biology 131: 83-92.

Wenzel SDA, Schäfers C, Vollmer G, Michna H, Diel P, Köln DS, Weg C-D. 2001. Research efforts towards the development and validation of a test method for the identification of endocrine disrupting chemicals. Contract 6: 000015.

WHO – World Health Organisation. 1999. Safe Management of Wastes from Health Care Activities, World **Health Organisation, Geneva.**

Williams-Brown MY, Salih SM, Xu X, Veenstra TD, Saeed M, Theiler SK, Diaz-Arrastia CR, Salama SA. 2011. The effect of tamoxifen and raloxifene on estrogen metabolism and endometrial cancer risk. J Steroid Biochem Molecular Biology 126: 78–86.

Wong C, Chen S. 2012.The development, application and limitations of breast cancer cell lines to study tamoxifen and aromatase inhibitor resistance. J Steroid Biochem Molecular Biology 131(3-5): 83-92

Xie H-J, Griskevicius L, Broberg U, Lundgren S, Carlens S, Meurling L, Paul C, Rane A, Hassan M, 2003. Alteration of pharmacokinetics of cyclophosphamide and suppression of the cytochrome P450 genes by ciprofloxacin. Bone Marrow Transplant 31: 197–203.

Yusuf AT, Vian L, Sabatier R, Cano JP. 2000. In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using HeP G2 cells. Mutation Research 468, 227-234.

Zegura B, Heath E, Cernosa A, Filipic M. 2009. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. Chemosphere 75: 1453–1460.

Zorita S, Mårtensson L, Mathiasson L. 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. Sci Total Environ 407 : 2760–2770.

Zounkova R, Kovalova L, Blaha L, Dott W. 2010. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. Chemosphere 81: 253–260.

Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R. 2005. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. Jl Hazardous Materials 122: 205–209.

Captions: Legends of figures

Figure 1: Chemical structure of Ciprofloxacin [CIP] (A); Tamoxifen [TAM] (B); Cyclophosphamide [CP] (C).

Figure 2: DNA adduct pattern of DNA (4µg) from HepG2 cells exposed to different condition during 24 h: (A) control; (B) cells exposed to TAM; (C) cells exposed to CIP+TAM mixture and (D) cells exposed to CTC mixture.

Figure 3: Total DNA adducts levels per 10^{9} nucleotides in HepG2 cells exposed 24h to CIP (white), TAM (gray) and CP (black), respectively. The results are expressed as median value ± SD corresponding to the median of 6 measurements (3 experiments, 2 replicates). Statistically different from control cell, at $p<0.05$ (*) and $p<0.01$ (**) compared to control cell.

Figure 4: Total DNA adducts level per $10^{\wedge 9}$ nucleotides in HepG2 cells exposed to CIP + TAM (hatched) or CTC (stippling) during 24h. The results are expressed as median value ± SD corresponding to the median value of 6 measurements (3 experiments, 2 replicates). Statistically significant at $p<0.05$ (*) and $p<0.01$ (**) compared to control cell; @ significant difference at $p<0.05$ between exposure to three drugs (CTC) compared to CIP + TAM. The concentration exposure are described in table 1 (section 2.3.).

Figure 5: DNA adduct pattern of DNA (4µg) from MCF-7 cells exposed to different condition during 24 h: (A) control; (B) cells exposed to TAM; (C) cells exposed to CIP+TAM mixture and (D) cells exposed to CTC mixture.

Figure 6: Total DNA adducts levels per 10^{9} nucleotides in MCF-7 cells exposed 24h to CIP (white), TAM (gray) and CP (black), respectively. The results are expressed as median value ± SD corresponding to the median of 6 measurements (3 experiments, 2 replicates). Statistically different from control cell, at $p<0.05$ (*) and $p<0.01$ (**) compared to control cell.

Figure 7: Total DNA adducts level per $10^{\wedge 9}$ nucleotides in MCF-7 cells exposed to CIP + TAM (hatched) or CTC (stippling) during 24h. The results are expressed as median value ± SD corresponding to the median value of 6 measurements (3 experiments, 2 replicates). Statistically significant at $p<0.05$ (*) and $p<0.01$ (**) compared to control cell; @ significant difference at $p<0.05$ between exposure to three drugs (CTC) compared to CIP + TAM. The concentration exposure are described in table 1 (section 2.3.).

Figure 8: DNA adduct pattern of DNA (4µg) from HepG2 cells exposed to (A) ultrapure water (negative control); (B) hospital effluent; (C) WWTP inflow; (D) WWTP outflow.

Figure 9: DNA adduct pattern of DNA (4µg) from MCF-7 cells exposed to (A) ultrapure water (negative control); (B) hospital effluent; (C) WWTP inflow; (D) WWTP outflow.

Figure 10: Total DNA adducts level per $10^{\wedge 9}$ nucleotides in HepG2 cells exposed during 24h to Hospital effluent (black), WWTP inflow effluent (gray) and WWTP outflow effluent (light-gray). The results are expressed as median value ± SD corresponding to the median value of 6 measurements (3 experiments, 2 replicates). Statistically significant at $p<0.01$ (**) compared to control cell; (a) significant difference ($p<0.05$) between exposure to hospital effluent compare to other conditions; (b) significant difference ($p<0.05$) between WWTP inflow compare to the other conditions; (c) significant difference ($p<0.05$) between WWTP outflow compare to the other conditions.

Figure 11: Total DNA adducts level per $10^{\wedge 9}$ nucleotides in MCF-7 cells exposed during 24h to Hospital effluent (black), WWTP inflow effluent (gray) and WWTP outflow effluent (light-gray). The results are expressed as median value ± SD corresponding to the median value of 6 measurements (3 experiments, 2 replicates). Statistically significant at $p<0.01$ (**) compared to control cell; (a) significant difference ($p<0.05$) between exposure to hospital effluent compare to other conditions; (b) significant difference ($p<0.05$) between WWTP inflow compare to the other conditions; (c) significant difference ($p<0.05$) between WWTP outflow compare to the other conditions.

Figure 12: Total of DNA breaks level in HepG2 cells exposed during 24h to Hospital effluent (black), WWTP inflow effluent (gray) and WWTP outflow effluent (light-gray). The results are expressed as median value ± SD corresponding to the median value of 6 measurements (3 experiments, 2 replicates). Statistically significant at $p<0.01$ (**) compared to control cell; (a) significant difference ($p<0.05$) between exposure to hospital effluent or WWTP inflow compare to WWTP outflow; (b) significant difference ($p<0.05$) between WWTP outflow compare to the other conditions.

Figure 13: DNA breaks induced on HepG2 cells exposed during 24h to Hospital effluent (black), WWTP inflow effluent (gray) and WWTP outflow effluent (light-gray). The results are expressed as median value ± SD (3 experiments, 2 replicates).

Figure 14: Metabolic pathways of tamoxifen leading to the formation of DNA-adduct (adapted from Shibutani *et al*., 2003, Gamboa Da Costa *et al*., 2001, 2007). CYP cytochrome P 450; Sult sulfotransferase; FMO flavin monooxygenase.

Figure 15: Scheme of interaction between the three drugs in relation with metabolic pathways of cyclophosphamide and tamoxifen (adapted from Huang et al. (2000) Desta et al. (2004).



Figure 1

A.

$C_{17}H_{18}FN_3O_3$

MM = 331.34 g.mol^{-1}

B.

$C_{26}H_{29}NO$

MM = 371.515 g.mol^{-1}

C.

$C_7H_{15}C_{12}N_2O_2P$

MM = 261.085 g.mol^{-1}

Figure 2

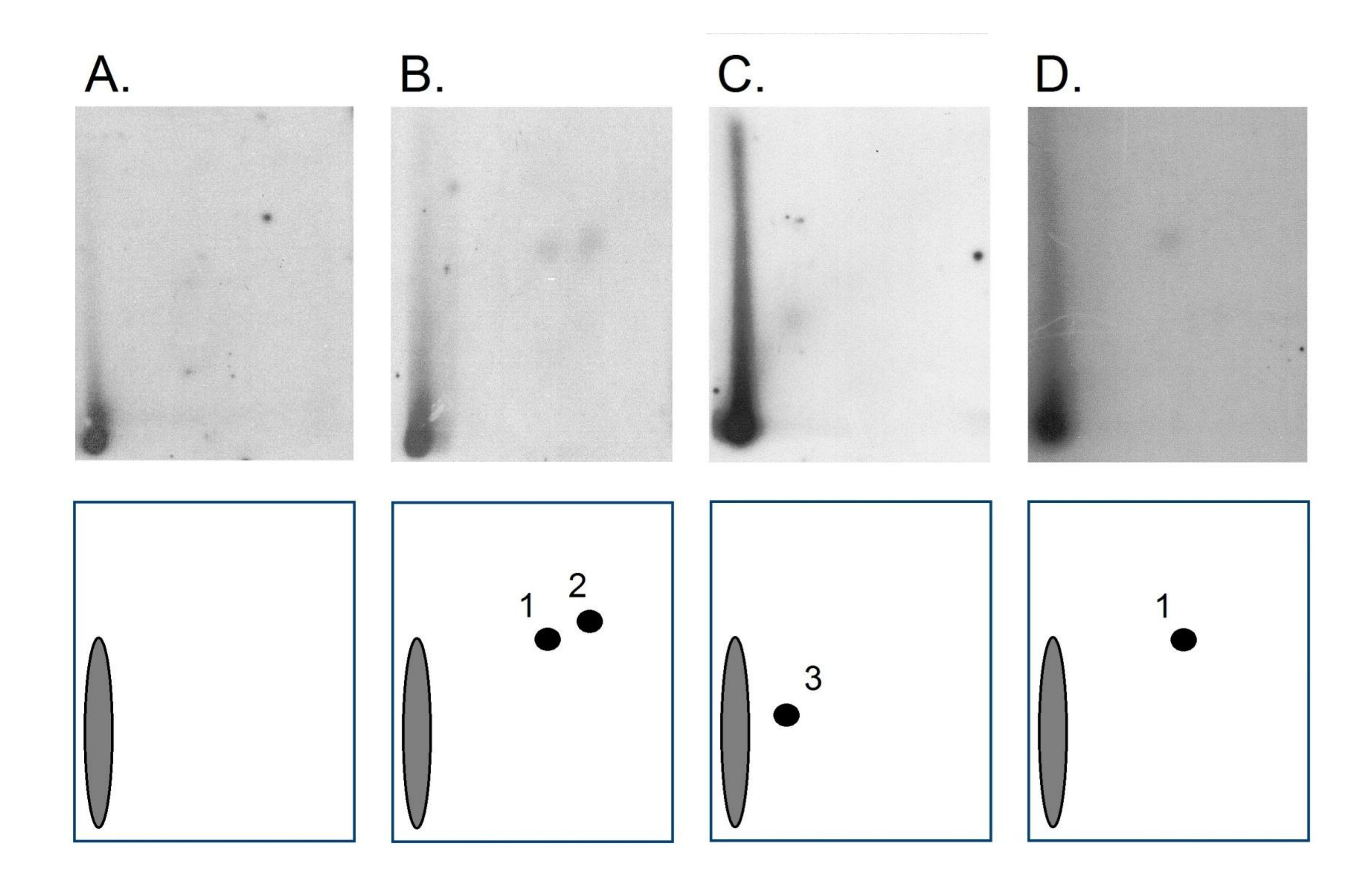


Figure 3

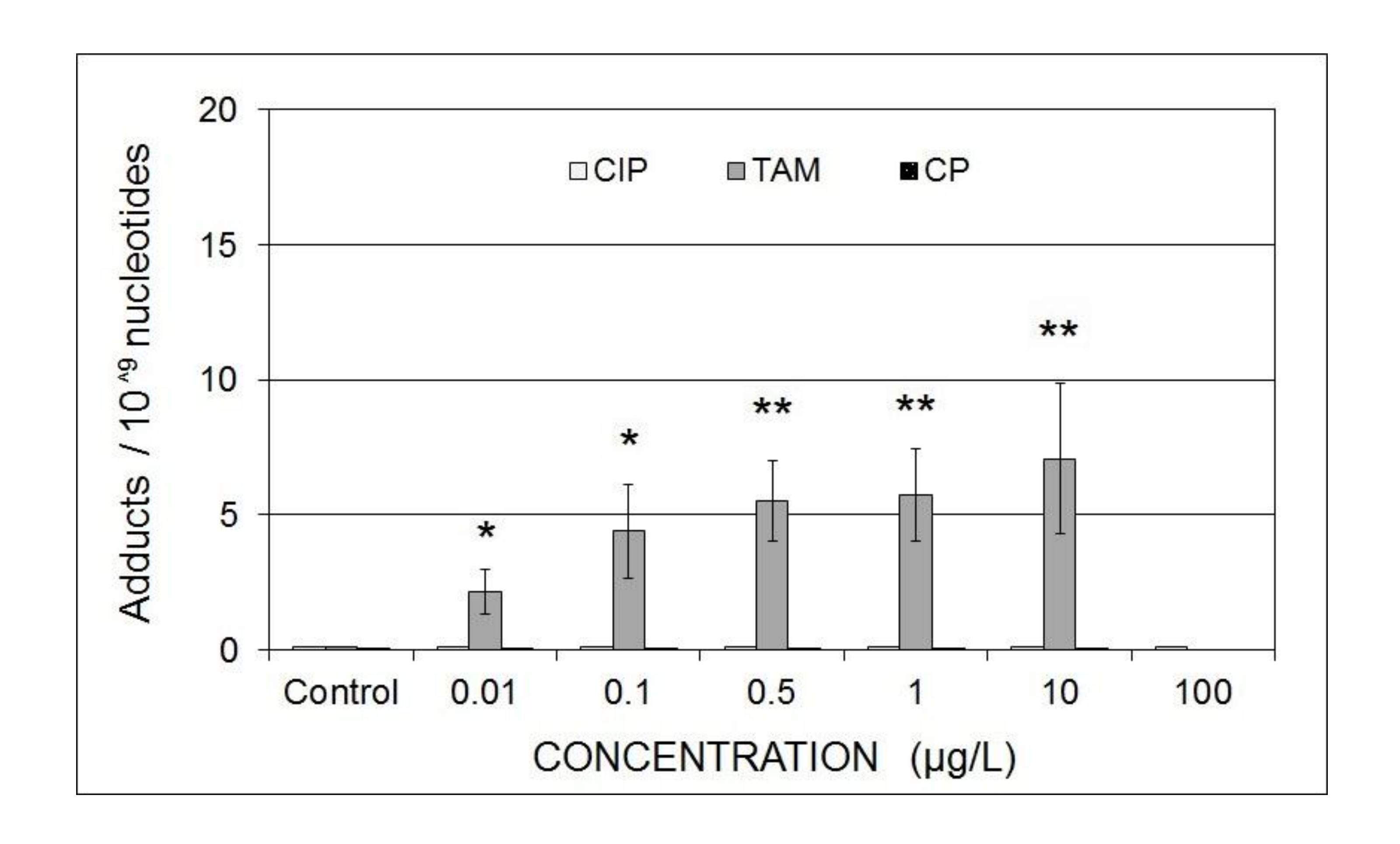
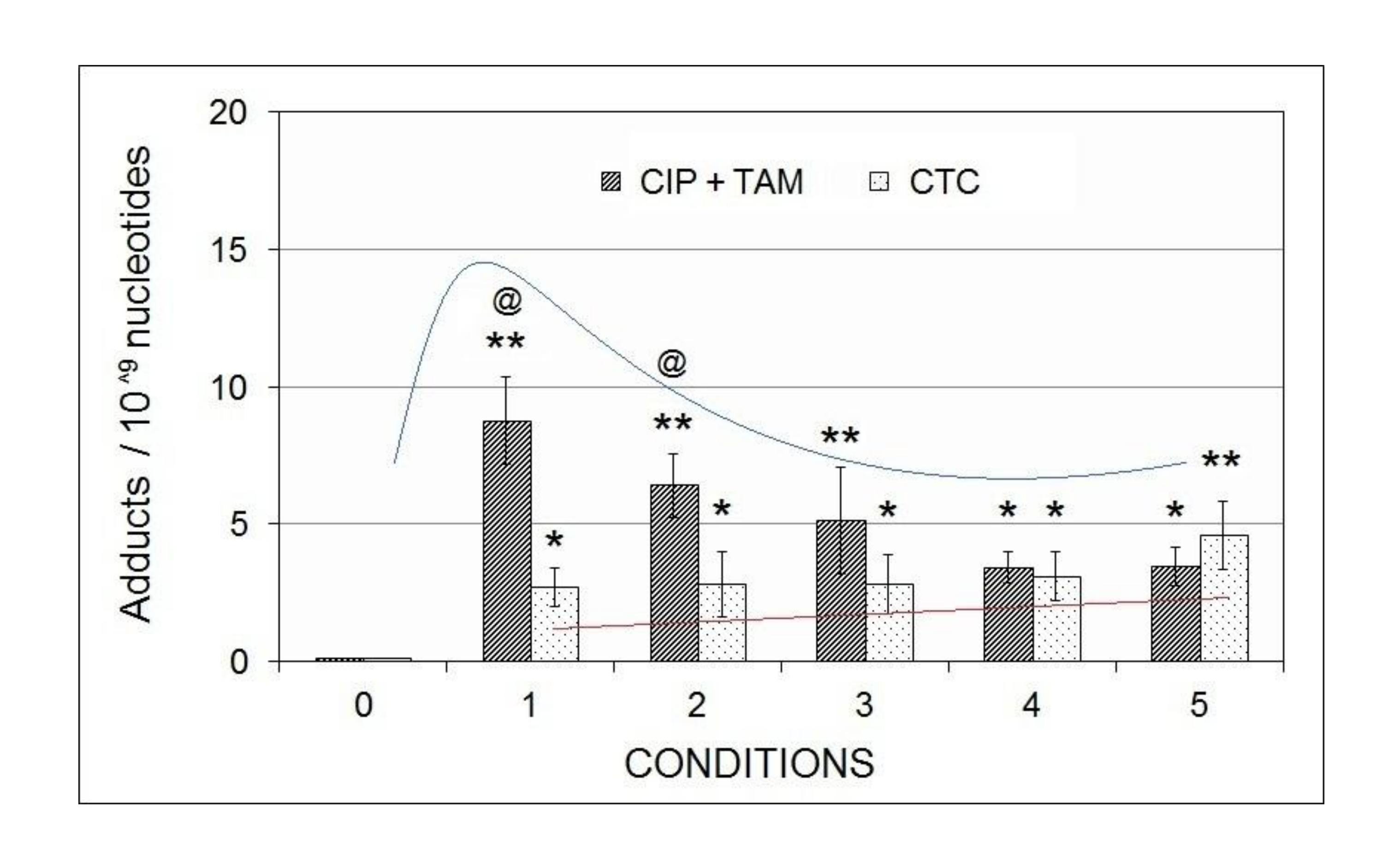

Adducts / 10 ^9 nucleotides
20
15
10
5
0
CIP
TAM
CP
*
*
**
**
**
Control
0.01
0.1
0.5
1
10
100
CONCENTRATION (µg/L)

Figure 4



CIP + TAM
CTC
Adducts / 10 ^9 nucleotides
20
15
10
5
0
@
**
@
**
**
**
*
*
*
* *
*
0
1
2
3
4
5
CONDITIONS

Figure 5

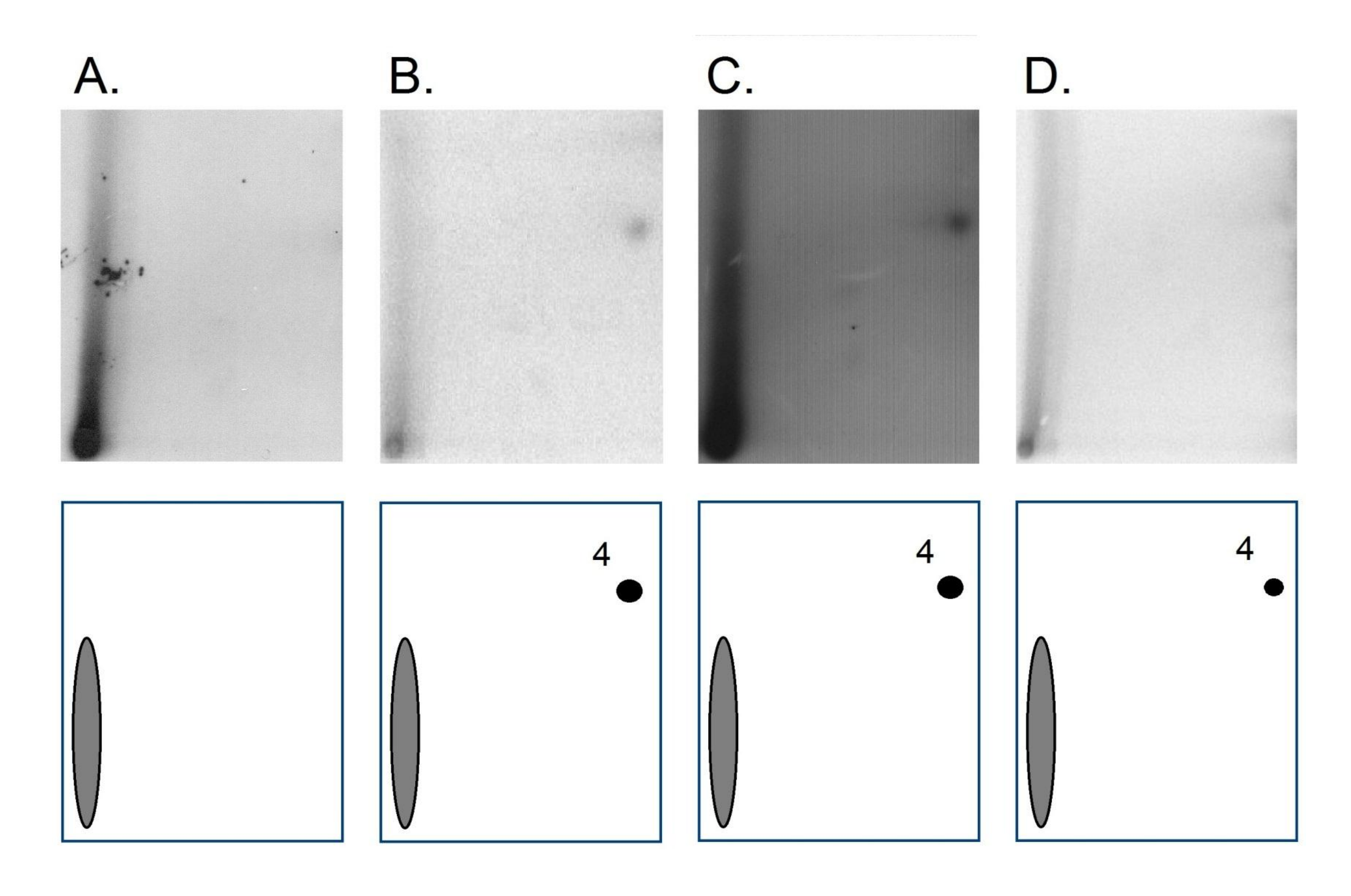
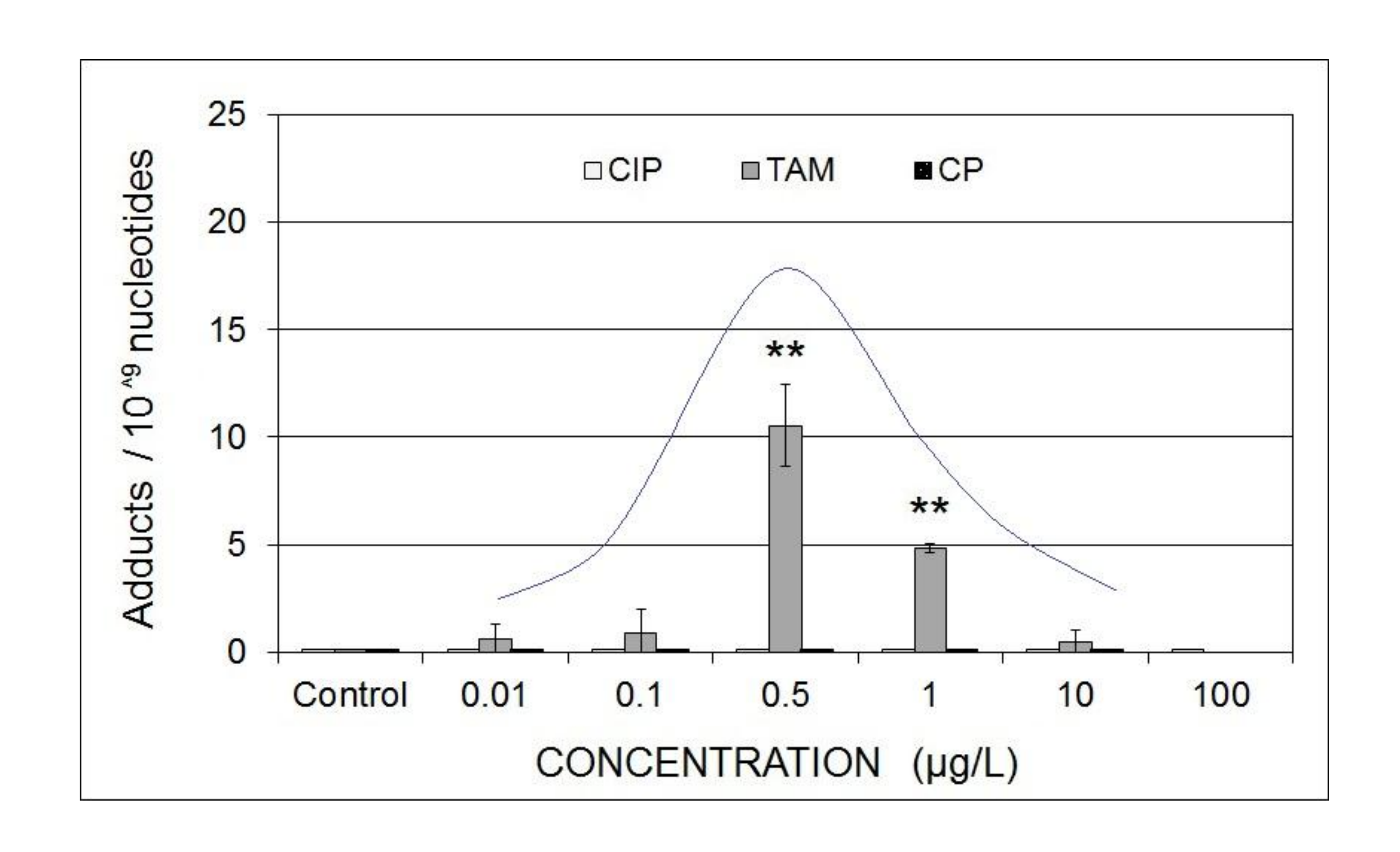


Figure 6



25
20
15
10
5
0
CIP
TAM
CP
**
**
Adducts / 10 ^9 nucleotides
Control
0.01
0.1
0.5
1
10
100
CONCENTRATION (µg/L)

Figure 7

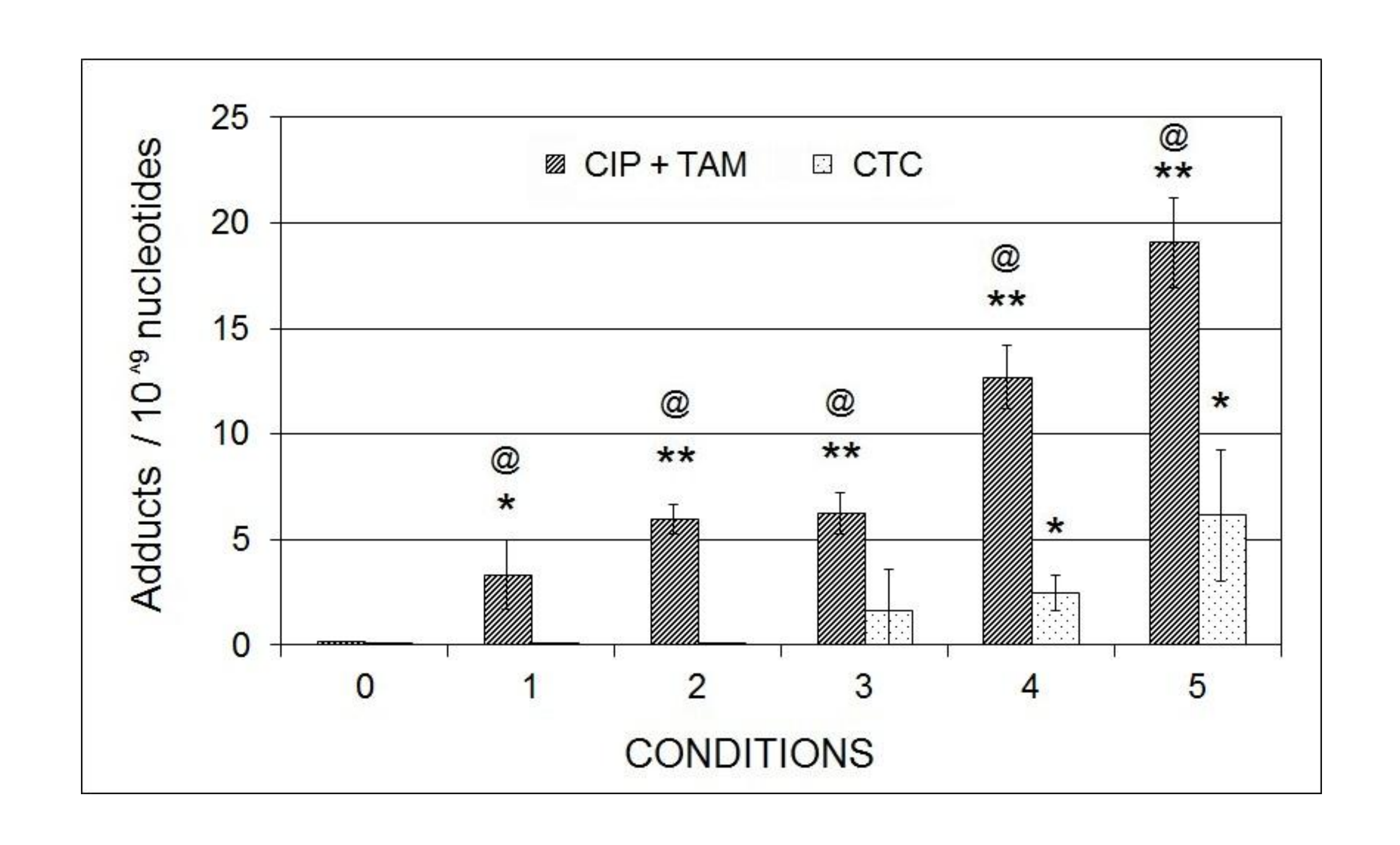

Adducts / 10 ^9 nucleotides
25
20
15
10
5
0
CIP + TAM
CTC
@
**
*
0
1
2
3
4
5
CONDITIONS

Figure 8

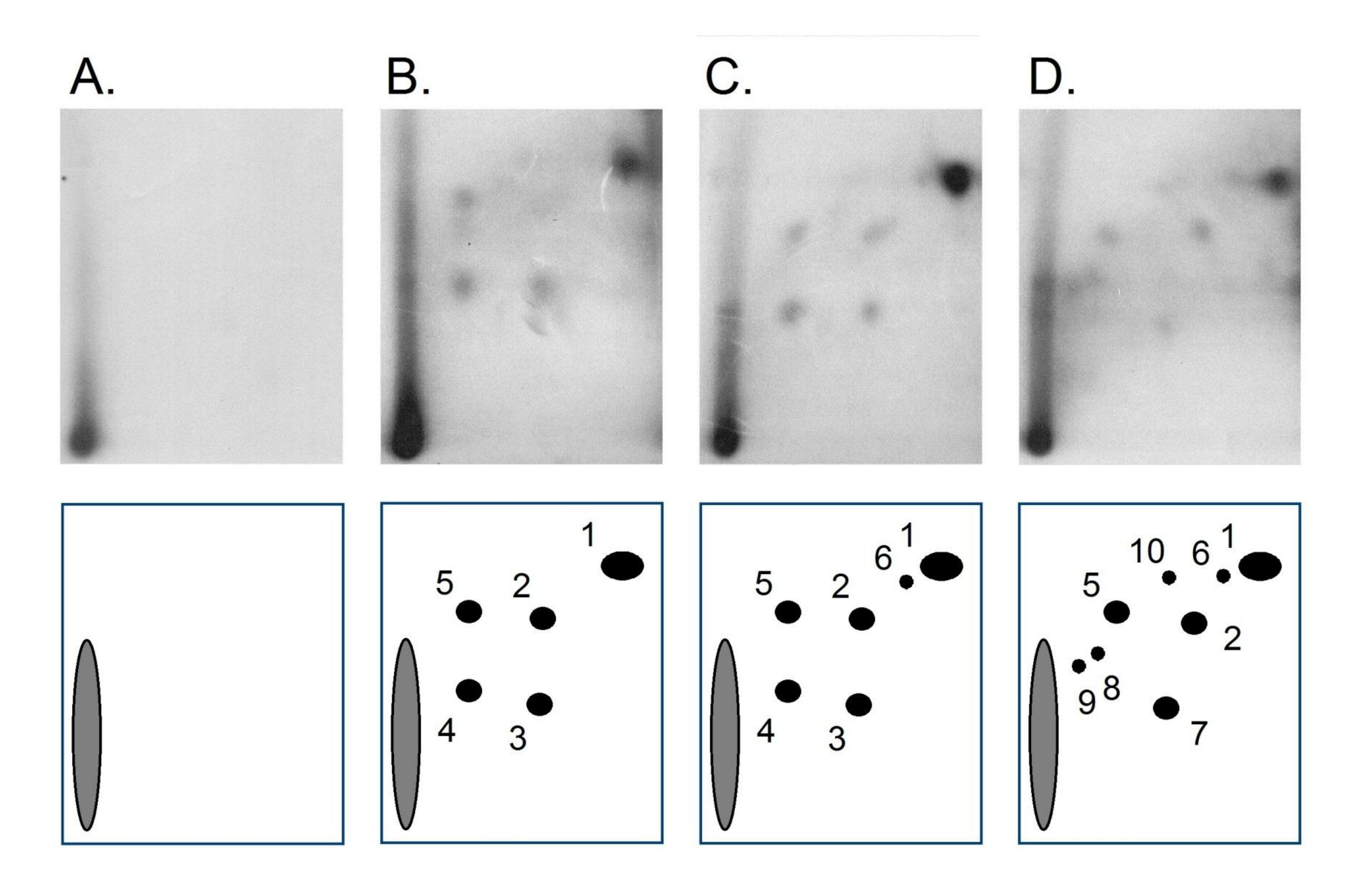


Figure 9

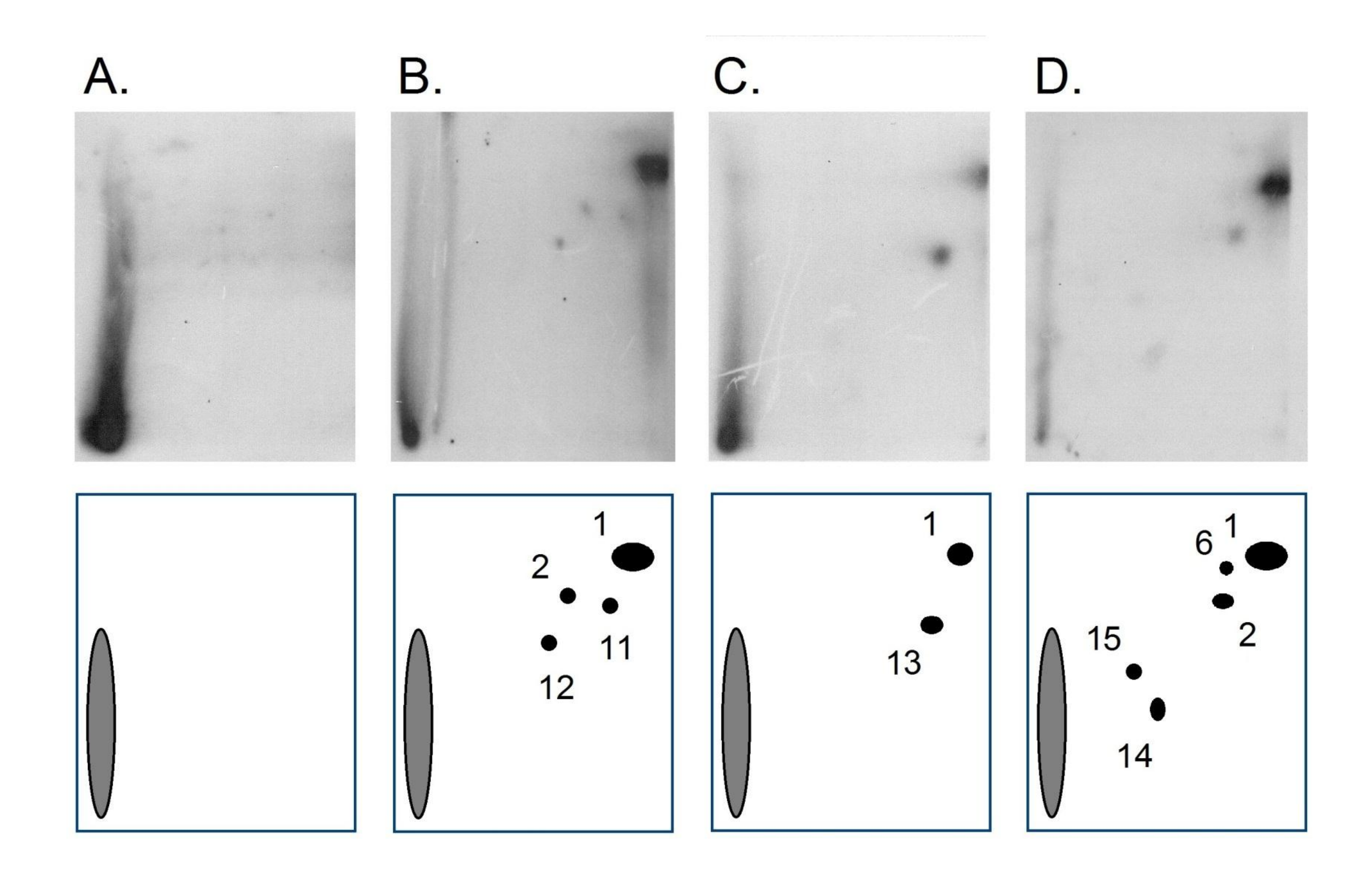


Figure 10

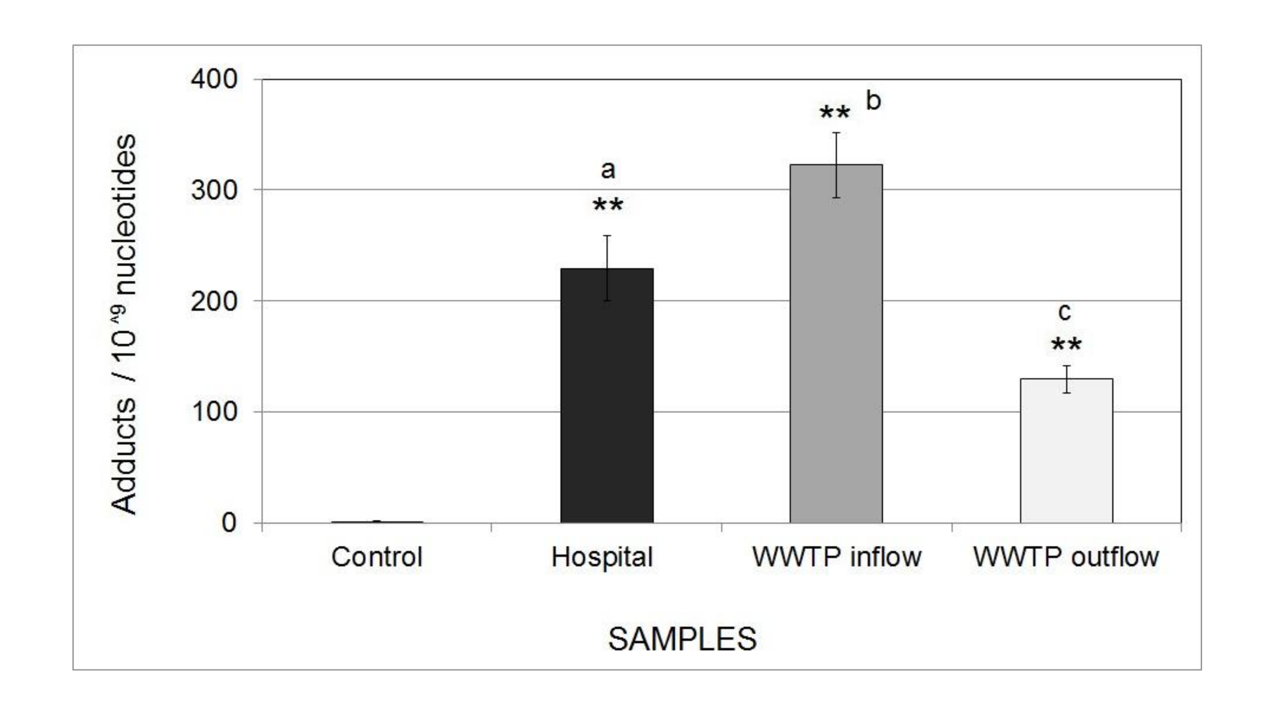

400
300
200
100
0
Adducts / 10 ^9 nucleotides
a
**
** b
c
**
Control
Hospital
WWTP inflow
WWTP outflow
SAMPLES

Figure 11

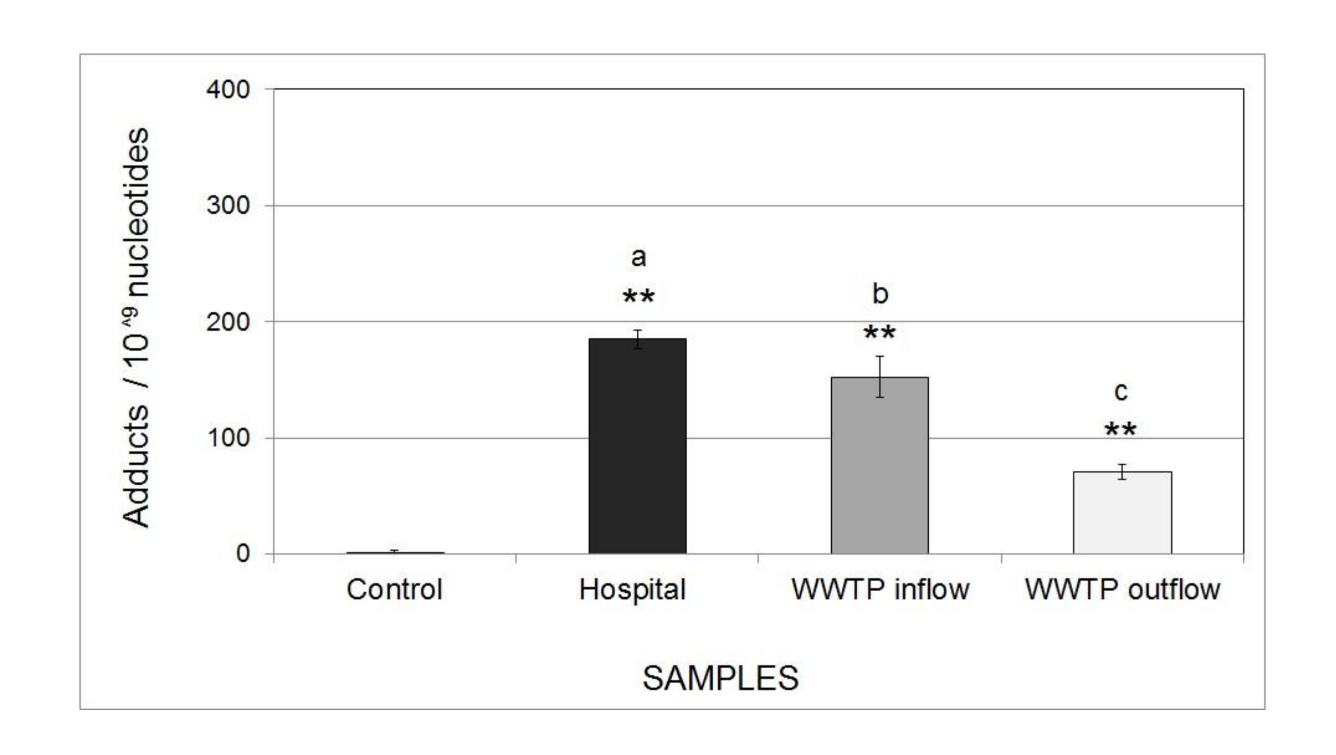

400
300
200
100
0
Adducts / 10 ^9 nucleotides
a
**
b
**
c
**
Control
Hospital
WWTP inflow
WWTP outflow
SAMPLES

Figure 12

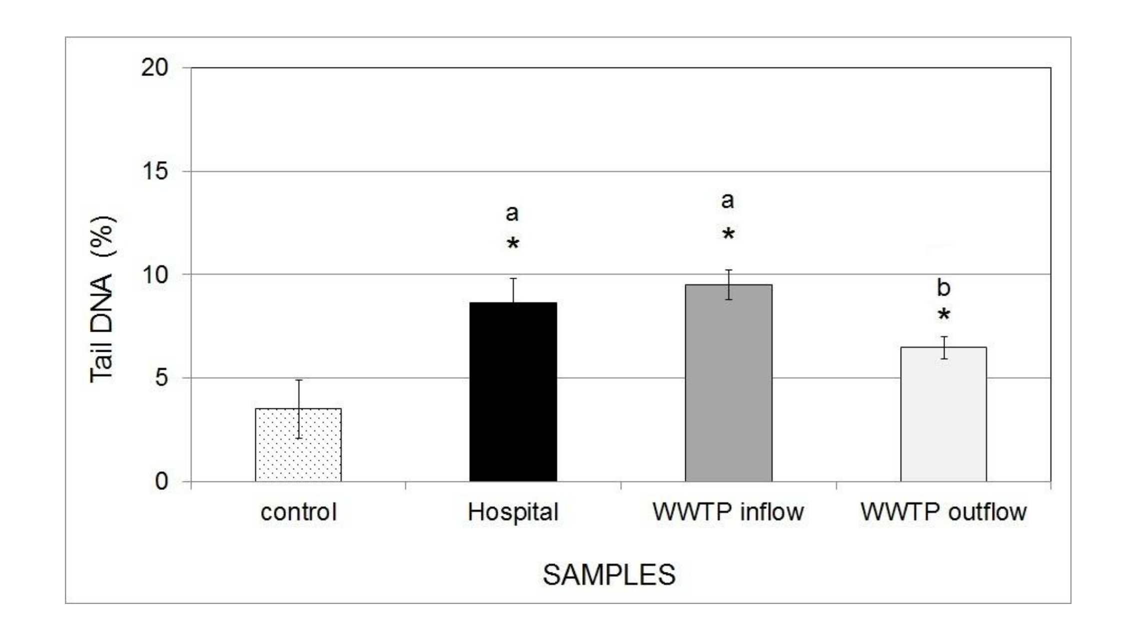

20
15
10
5
0
Tail DNA (%)
a
*
a
*
b
*
control
Hospital
WWTP inflow
WWTP outflow
SAMPLES

Figure 13

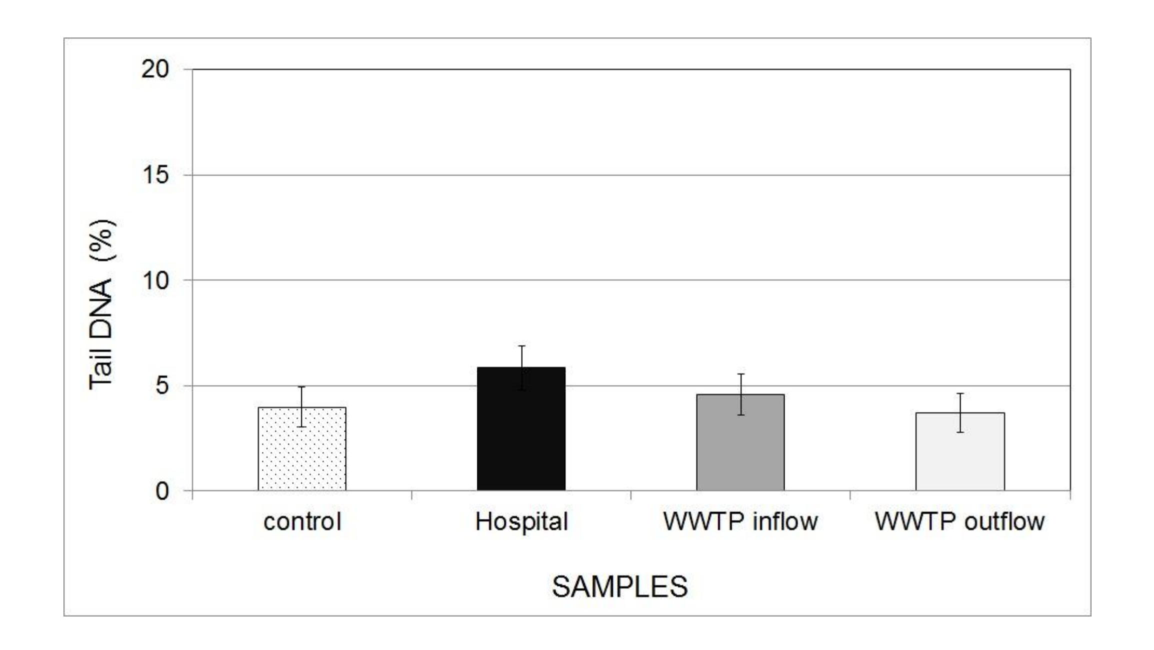
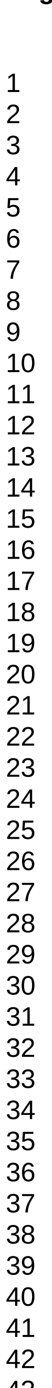

20
15
10
5
0
Tail DNA (%)
control
Hospital
WWTP inflow
WWTP outflow
SAMPLES

Figure 14



3,4-Dihydroxytamoxifen → *o*-Quinone —DNA→ Adduct

aromatase

CYP 2D6

4-Hydroxytamoxifen → 4-Hydroxytamoxifen quinone methide —DNA→ (*E*)-α-(Deoxyguanosin-N^2-yl)-4-Hydroxytamoxifen

TAMOXIFEN

FMO1

Tamoxifen-*N*-oxide —DNA→ Adduct

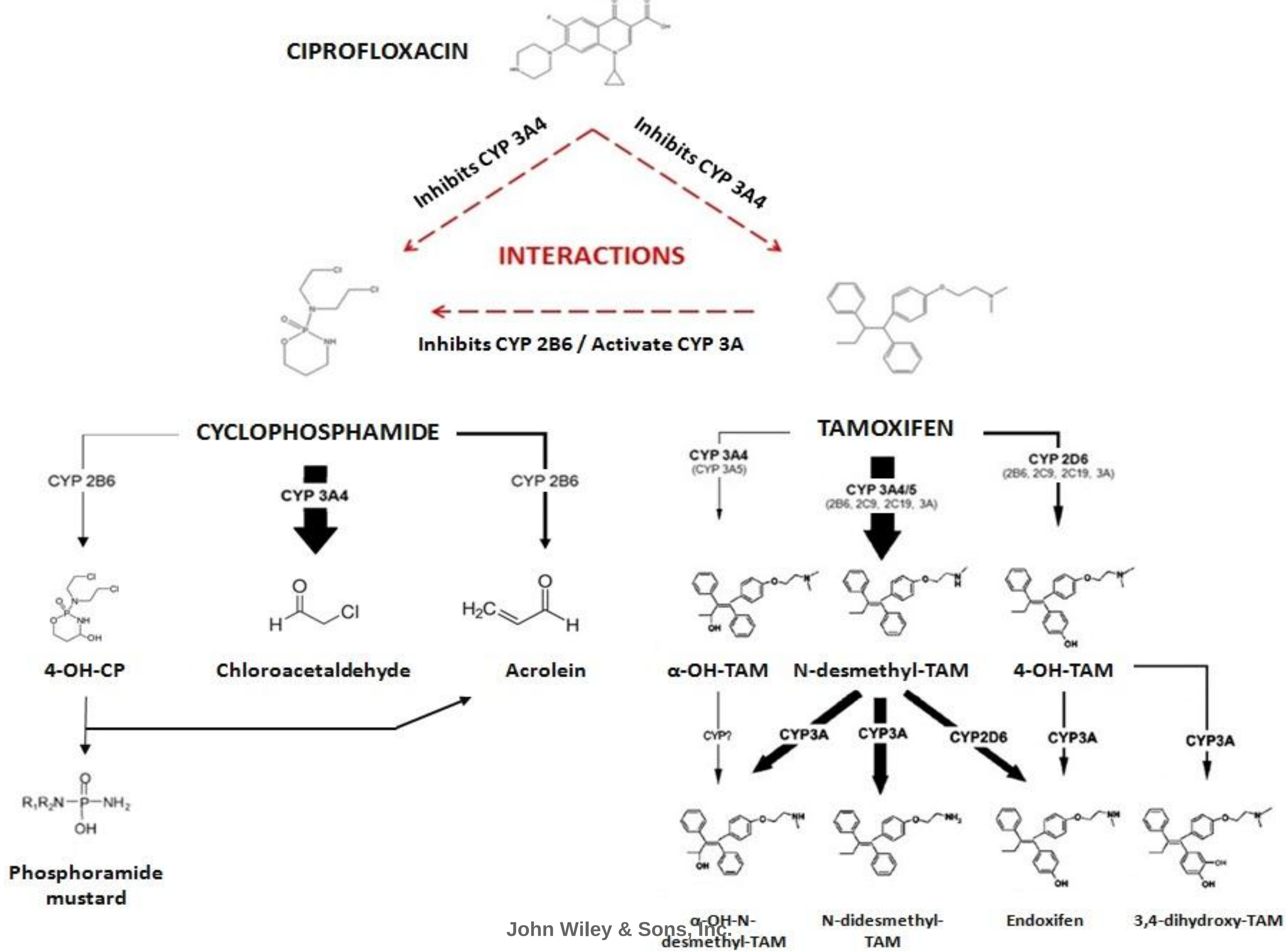
CYP 3A

α-Hydroxytamoxifen —Sult→ α-Sulfoxytamoxifen —DNA→ (*E*)-α-(Deoxyguanosin-N^2-yl)-tamoxifen

CYP 1A1
CYP 3A

N-Desmethyl-tamoxifen —CYP 3A→ α-Hydroxy-*N*-des-methyltamoxifen —Sult→ α-Sulfoxy-*N*-des-methyltamoxifen —DNA→ (*E*)-α-(Deoxyguanosin-N^2-yl)-*N*-desmethyl-tamoxifen

Figure 15


CIPROFLOXACIN
Inhibits CYP 3A4
Inhibits CYP 3A4
INTERACTIONS
Inhibits CYP 2B6 / Activate CYP 3A
CYCLOPHOSPHAMIDE
CYP 2B6
CYP 3A4
CYP 2B6
TAMOXIFEN
CYP 3A4
(CYP 3A5)
CYP 3A4/5
(2B6, 2C9, 2C19, 3A)
CYP 2D6
(2B6, 2C9, 2C19, 3A)
4-OH-CP
Chloroacetaldehyde
Acrolein
α-OH-TAM
N-desmethyl-TAM
4-OH-TAM
CYP?
CYP3A
CYP3A
CYP2D6
CYP3A
CYP3A
Phosphoramide mustard
α-OH-N-desmethyl-TAM
N-didesmethyl-TAM
Endoxifen
3,4-dihydroxy-TAM

Résumé **:**

En Europe, le nombre de cancers est en constante augmentation et explique l'augmentation des traitements. Les bases de ces traitements sont la chimiothérapie et la radiothérapie, seules ou en association. Les chimiothérapies sont effectuées à l'aide de médicaments anticancéreux qui ont des propriétés toxiques pour les cellules. Après administration des traitements aux patients, les médicaments sont excrétés et se concentrent dans les effluents hospitaliers et les réseaux d'égouts. Bien que beaucoup de ces composés soient éliminés dans les stations d'épuration, certains sont difficilement biodégradables et sont directement rejetées dans le milieu naturel où ils représentent un risque toxique pour la flore, la faune et l'Homme. Bien que les concentrations soient faibles (ng/L - µg/L), très peu de données sont disponibles sur leurs impacts écotoxicologiques. Leur présence dans l'environnement est d'autant plus préoccupante que les produits de métabolisation sont souvent plus toxiques que la substance d'origine.

L'objectif de la thèse a été d'évaluer le risque (éco)toxicologique induit par de faibles doses de médicaments rejetés seuls ou en mélanges dans les effluents hospitaliers, urbains et dans l'environnement. De par leur utilisation courante dans les traitements anticancéreux, trois molécules ont été sélectionnées pour notre étude : la ciprofloxacine (antibiotique), le tamoxifène (perturbateur endocrinien), et le cyclophosphamide (anticancéreux). Des gammes de concentrations représentatives des effluents hospitaliers, station d'épuration et de l'environnement ont été testées à l'aide de bioessais appliqués à des organismes aquatiques (*V. fischeri*, *P. subcapitata*, *L. minor*) et de biomarqueurs appliqués à une levure (*S. cerevisiae*) et des cellules humaines hépatiques et mammaires. La viabilité cellulaire (test MTS) et la génotoxicité (cassures à l'ADN et adduit à l'ADN) ont été comparés aux tests standardisés Microtox ®, Algaltoxkit F™, ainsi que d'inhibition de croissance de *Lemna minor*. Le potentiel perturbateur endocrinien a été évalué en parallèle à l'aide du test YES/YAS. Cette batterie de tests a ensuite été appliquée a des effluents bruts (hospitaliers, station d'épuration) pour en évaluer le potentiel (géno)toxique. Des échantillons à proximité de l'hôpital de Gérone (Espagne) ont été prélevés en sortie de l'hôpital, en entrée et en sortie de station d'épuration, pendant trois mois consécutifs.

Plusieurs effets de toxicité ont été observés sur les modèles d'étude, comme notamment l'apparition de phénomènes d'hormèses sur la viabilité des cellules hépatiques exposée au tamoxifène et à la ciprofloxacine, seuls ou en mélange. Le même schéma est observé pour les mélanges avec le test Microtox®. D'autre part, l'exposition respective des cellules hépatiques et mammaires aux médicaments n'entraîne pas de cassures de l'ADN et entraine l'apparition d'adduits seulement avec le tamoxifène, alors qu'on note une augmentation dose-dépendant des cassures et des adduits à l'ADN après exposition aux mélanges. De même, une réponse positive est observée avec le test Algaltox F™. Concernant les effluents, les effets dépendent à la fois du type d'organisme et du temps d'exposition. Les tests Microtox®, Algaltox F™ et le post-marquage des adduits à l'ADN sont apparus être les pertinents pour l'analyse.

Les interactions observées entre les composés mettent en avant la nécessité d'évaluer les effets des contaminants à petites doses en mélanges, à plusieurs temps d'exposition et avec différents tests. L'application d'une telle batterie de tests à des échantillons environnementaux permet de qualifier les effluents et de suivre l'efficacité de moyens d'épuration. A terme, son application pourrait permettre de mieux appréhender les risques (éco)toxiques associés aux rejets de médicaments dans l'environnement et pouvant être à l'origine de cancer secondaire chez l'Homme.

Mots clés : Ciprofloxacine, Tamoxifène, Cyclophosphamide, Effluents hospitaliers, Bioessais, Biomarqueurs, Génotoxicité, Adduits à l'ADN, Hormèse.

Abstract **:**

In Europe, cancers rate is constantly raising, which explain the increase in treatments. They are usually chemotherapy and radiotherapy, alone or combine. Chemotherapy is done with anticancer drugs with toxic characteristics on cells. After administer the treatments to the patients, some of the drugs are excreted in significant proportion and released in hospital and communal effluents. Even though a lot of the compounds are either removed by adsorption or bio-degradation in waste water treatment plant (WWTP), some of their are not are directly released in the environment and represent a toxic risk for aquatic organisms and the Human health. Despite low concentrations (ng/L-µg/L), few data are available about the ecotoxicological impact. The importance of chemical compounds pollutants, especially anticancer drugs, are a real concern because the metabolites of the chemicals are even more toxic than the original substance.

The aim of the thesis is to develop a battery based approach to evaluate the risks induct by low doses of drugs released independently or in mixture, in hospital waste water. Because of their common use in anticancer treatment procedures, three molecules have been chosen for our study: ciprofloxacin (antibiotic), tamoxifen (endocrine disruptor), cyclophosphamide (anticancer). Concentrations were range from hospital sewers and WWTP to the environment have been tested with a battery base approach using standardized bioassays applied on aquatic organisms (V fischeri, S. subcapitata, L. minor) and biomarker applied on yeast (*S. cerevisia*), hepatic and mammary human cell lines. Cell viability (test MTS) and genotoxicity (DNA breaks, DNA adducts) were compared with the standardized bioassays Microtox®, Algaltoxkit F™, and *Lemna minor* growth inhibition. In parallel, the endocrine disruptor activity was estimated the YES/YAS assay. The battery assay was then applied to evaluate the (geno)toxicity of raw effluents (hospital, wastewater-treatment plant). Samples from the hospital of Girona (Spain) were taken got out of it from the hospital, in entrance and got out of it from water-treatment plant, during three consecutive months.

Several toxic effects have been observed during this work on aquatic organisms and both human cell lines. Results show especially hormetic effect on viability of hepatic cell line exposed to ciprofloxacin and tamoxifen alone or in mixture. Same results were observed the Microtox assays after mixtures exposures. On the other hand, the individually hepatic and mammary cell exposure to the drugs doesn't induce DNA break, and induce DNA adduct only with the tamoxifen. Furthermore, we observe a dose-dependent increasing of the DNA break and adduct if the cells are exposed in mixture. Same results were observed with Algaltox F™. Concerning the effluents, effects depending on the kind of organisms and time exposure. The Microtox ®, Algaltox F ™ and the DNA adducts post-labelling appeared to be the most relevant for the analysis.

The interactions observed between drugs pinpoint the necessity to assess the effect of contaminants in low doses mixtures, at many exposure times, and using different tools. The application of this battery with environmental raw samples is in use to rank outflows toxicity and follow the WWTP efficiency, which could lead to a better understanding of the human health risks.

Keywords : Ciprofloxacin, Tamoxifen, Cyclophosphamide, Hospital effluents, Bioassays, Biomarkers, Genotoxicity, DNA adducts, Hormesis.